Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert)

Porphyrin- und Hämsynthese bei Achromobacter metalcaligenes

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang K. Philipp- Dormston
aus Marburg

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert)

Porphyrin- und Hämsynthese bei Achromobacter metalcaligenes

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wolfgang K. Philipp- Dormston
aus Marburg

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 8. 6. 1972
gedruckt mit Genehmigumg des Fachbereichs
Dekan: Prof.Dr.med. Heinrich Oepen
Referent: Prof.Dr.med. Manfred Doss
Correferent: Prof.Dr.med. Rudolf Siegert

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Siegert, Direktor des Hygiene-Instituts der Universität Marburg, danke ich für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die großzügige Förderung bei der Durchführung der Arbeit.

In gleicher Weise bin ich Herrn Prof. Dr. med. Manfred Doss für die Überlassung des Themas und die experimentelle Anleitung und Einarbeitung zu Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	Einleitung	1
I.	Historische Entwicklung	1
II.	Biosynthese der Porphyrine und der prosthetischen Gruppe der Cytochrome	3
III.	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	6
B.	Material und Methoden	8
I.	Mikrobiologischer Teil	8
	a) Testkeime	8
	b) Medien	8
	c) Kultivierung	9
	d) Aufsarbeiten der Kulturen	11
II.	Chemischer Teil	12
	a) Reagenzien	12
	b) Vergleichssubstanzen	12
	c) Apparate	12
	d) Methoden	13
	1. Isolierung und Bestimmung von Porphyrinen und Häm	13
	1.1. Veresterung der Tetrapyrrole	13
	1.2. Extraktion der Tetrapyrrolmethylester	13
	1.3. Dünnschichtchromatographie	14
	1.4. Spektrophotometrische Analyse	15
	1.5. Fluorometrische Auswertung der Chromatogramme	15
	1.6. Photographische Dokumentation	15
	1.7. Spektophotometrische Analyse von Cytochromen in intakten Zellen	15
	2. Isolierung und Bestimmung von δ-Aminolävulinsäure und Porphobilinogen	16
	2.1. Aufschluß der Zellen	16
	2.2. Säulenchromatographische Trennung und spektrophotometrische Analyse	16

Seite

3. Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität 17

3.1. Herstellung eines zellfreien Extraktes 17

3.2. Bestimmung der Enzymaktivität 17

C. Ergebnisse und Besprechung 18

I. Vergleich der Synthese von Porphyrinen und Protohämin in wachsenden Kulturen von E. coli, Ps.aeruginosa und A. metalcaligenes 19

II. Verteilung von Protohämin und Porphyrinen zwischen Zellen und Medium 28

III. Porphyrin- und Hämsynthese im zeitlichen Verlauf der Inkubation bei A. metalcaligenes 31

IV. Einfluß verschiedener Substrate auf die Synthese cyclischer Tetrapyrrole bei A. metalcaligenes 35

a) Wachstum und Tetrapyrrolsynthese in Medien mit einem Substrat 35

b) Wachstum und Tetrapyrrolsynthese in Medien mit zwei Substraten 35

c) Vergleich der Tetrapyrrolsynthese in definierten und komplexen Medien 37

d) Stimulierung der Tetrapyrrolsynthese durch Lactat in resuspendierten Zellen 37

e) Stimulierung der Tetrapyrrolsynthese durch Lactat bei E. coli 40

f) Diskussion 44

V. Einfluß der Belüftung auf die Porphyrin- und Protohämsynthese bei A. metalcaligenes 47

Seite

VI. Einfluß des Eisens auf die Synthese von Porphyrinen und Protohämin bei A. metalcaligenes. 50

a) Untersuchungen mit A. metalcaligenes 50
b) Vergleichende Untersuchungen mit E. coli, Ps. aeruginosa und Rhodopseudomonas spheroides 59
c) Diskussion 64

D. Zusammenfassung 68

E. Literatur 71

F. Abbildungs- und Tabellennachweis 93

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534913_0011

A. EINLEITUNG

I. Historische Entwicklung

1841 berichtete SCHERER[169] über Untersuchungen, bei denen er aus getrocknetem und pulverisiertem Blut nach Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure einen eisenfreien Extrakt hergestellt hätte, der nach Aufkochen mit Alkohol diesen intensiv rot gefärbt hätte. Er folgerte, daß die rote Farbe des Blutes nicht vom Eisen herrühren könnte. Ähnliche Versuche beschrieb MULDER[138] 1844, der die isolierte Substanz als "eisenfreies Hämatin" definierte. TUDICHUM[187] konnte 1867 für diesen Stoff, den er "cruentine" nannte, ein Spektrum festlegen und die auffällige Fluoreszenz nachweisen. 1871 zeigte HOPPE-SEYLER[83], daß das "eisenfreie Hämatin" ein Gemisch war, dessen Hauptbestandteil er als Hämatoporphyrin bezeichnete. Das Hämatoporphyrin wurde 1888 von NENCKI und SIEBER[141] als ein Derivat des Protohämins erkannt.

Die chemische Struktur der in der Natur vorkommenden Porphyrine wurde von FISCHER und seiner Schule aufgeklärt[57,58]. Neben einer Vielzahl linearer und zyklischer Pyrrolverbindungen synthetisierte FISCHER auch Protohämin und die zwölf Isomeren des Protoporphyrins. Das Isomer IX war mit dem im biologischen Material vorkommenden Protoporphyrin identisch.

Angeregt durch die klinischen Forschungen der Porphyrien, die erstmals 1911 von GÜNTHER[75] klassifiziert wurden, untersuchte FISCHER den Urin des Patienten PETRY[56], der an einer congenitalen erythropoetischen Porphyrie erkrankt war. Er wies nach, daß unter normalen wie pathologischen Stoffwechselbedingungen nicht Hämatoporphyrin, sondern Kopro- und Uroporphyrin ausgeschieden werden. Das als Hämatoporphyrin bezeichnete Derivat erwies sich als Kunstprodukt. WALDENSTRÖM[192] gab 1937 unter Berücksichtigung der neugewonnenen chemischen Erkenntnisse eine Einteilung der Porphyrien, die mit Abänderungen noch heute verwendet wird.

Bei Bakterien konnten Porphyrine in phototrophen und heterotrophen Gattungen nachgewiesen werden. VAN NIEL[145] fand 1944 in den Kulturmedien vieler phototropher Formen aus der Gruppe Athiorhodaceae rote Pigmente, die LASCELLES[103] als ein Gemisch aus Kopro- und Uroporphyrin erkannte. 1947 entdeckte erstmals PAPPENHEIMER[151] bei unter Eisenmangelbedingungen inkubierten Kulturen von Corynebacterium diphtheriae neben dem Toxin erhebliche Mengen von Koproporphyrin.

Die freien Porphyrine sind Nebenprodukte der Biosynthese, die unter physiologischen Bedingungen nur in geringen Mengen auftreten und ausgeschieden werden. Außerdem kommen Porphyrine auch als Pigmente ohne weitere biochemische Funktion vor, wie das Turazin, ein Kupfersalz des Uroporphyrins, als Federfarbstoff der Helmvögel (Turacus fischeri)[78].

Die Chemie der Porphyrine, Metallporphyrine und ihrer Derivate sowie neue Verfahren ihrer chemischen Synthese werden von FALK[51,52], ZEILE[202] und IMHOFFEN et al.[85] dargestellt.

II. Biosynthese der Porphyrine und der prosthetischen Gruppen der Cytochrome

Die Grundzüge der Tetrapyrrolbiosynthese wurden zunächst an Zellen, Zellextrakten oder isolierten Zellorganellen homoiothermer Tiere (Vogelerythrocyten[62,113,176], Reticulocyten[115,128], Erythrocyten[64,69], Leberzellen[65,66], Hämolysaten von Hühnererythrocyten[48,49], Lebermitochondrien[71,166,167]) aufgeklärt. Hinzu traten ergänzende Untersuchungen an pflanzlichen[7,8,9,70] und prokaryontischen Zellen[61,106,107].

Mit Hilfe der Isotopentechnik konnte gezeigt werden, daß ^{2}H-Acetat und ^{15}N-Glycin in Protoporphyrin eingebaut werden[6,174,175]. Als erstes Intermediärprodukt wurde die δ-Aminolävulinsäure (γ-Keto-δ-aminovaleriansäure) ermittelt, die aus Succinyl-Coenzym A und Glycin unter gleichzeitiger, wahrscheinlich spontaner Decarboxylierung einer Zwischenstufe (α-Amino-β-Ketoadipinsäure) entsteht[140,177]. Die δ-Aminolävulinsäure-Synthase konnte von BURNHAM und LASCELLES[14] aus Rhodopseudomonas spheroides angereichert werden.

Das zweite Intermediärprodukt, das Monopyrrol Porphobilinogen, wurde 1952 von WESTALL[195] aus dem Urin von Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt. Den Einbau von Porphobilinogen in den Porphyrinring bewiesen FALK et al.[53]. Die δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase (5-Aminolaevulinate Hydrolyase (adding 5-aminolaevulinate and cyclizing) EC 4.2.1.24), die zwei Mol δ-Aminolävulinsäure zu einem Mol Porphobilinogen unter Freisetzung von Wasser kondensiert, wurde von GIBSON et al.[61] gereinigt und charakterisiert.

Aus vier Molekülen Porphobilinogen entsteht durch zwei verschiedene Enzymfraktionen, die Porphobilinogen-Desaminase und die Uroporphyrinogen-Isomerase[7,82], über noch nicht identifizierte Zwischenprodukte von Di- und Poly-Pyrrolmethanverbindungen Uroporphyrinogen. Das Enzymsystem wurde bei Chlorella[7] und in Erythrocytenhämolysaten[128] gefunden.

NEVE et al.[144] zeigten, daß nur mit Uroporphyrinogen, nicht aber mit Uroporphyrin ein Einbau von ^{59}Fe in Häm erfolgt. Weitere Untersuchungen bestätigten, daß nur die hydrierten Formen der Porphyrine, die Porphyrinogene, die physiologischen Intermediärstufen der Hämbiosynthese sind.

Uroporphyrinogen-III (I) wird durch die Uroporphyrinogen-Decarb-

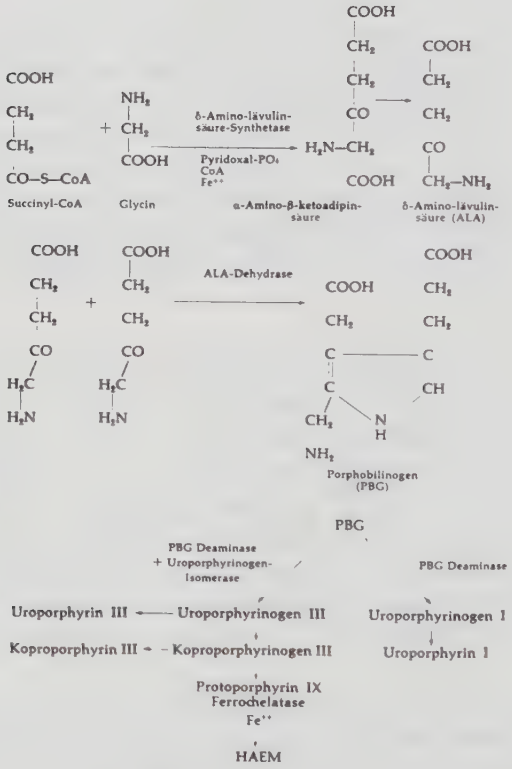

Abb. 1. Schematische Darstellung der Hämbiosynthese (n. GRAY [72])

oxylase (Uroporphyrinogen-III-carboxy-lyase EC 4.1.1.37) zu Koproporphyrinogen schrittweise decarboxyliert, wobei Zwischenstufen mit 7,6 und 5 Carboxylgruppen auftreten und die Frage noch offen ist, ob ein oder mehrere Enzyme an der Reaktion, die hinsichtlich der Isomerenreihen stereospezifisch verläuft, beteiligt sind[128].

Durch die Koproporphyrinogen-Oxydase entsteht das Protoporphyrinogen III[154]. Das Enzym, das die Propionsäureseitenketten oxydativ decarboxyliert, zeichnet sich durch hohe Substratspezifität für das Isomer III aus und ist in der tierischen Zelle in den Mitochondrien lokalisiert[166]. Da in der Natur Protoporphyrin und Häm der Isomerenreihe I bisher nicht entdeckt wurden, wurde gefolgert, daß sie unter physiologischen Bedingungen nur in der Isomerenreihe III entstehen. Dies veranlaßte GRANICK und MAUZERALL[69], die Bezeichnung Protoporphyrinogen III anstelle von IX (Nomenklatur von FISCHER[57]) einzuführen.

Der Einbau von Eisen kann in physiologisch adäquaten Verhältnissen durch Inkubation von Protoporphyrin mit Eisen bei 37°C auch nicht enzymatisch erfolgen[76]. In vivo ist auch für diesen Schritt ein Enzymsystem verantwortlich, die Ferrochelatase (Protohaem ferro-lyase EC 4.99.1.1), die zuerst in Mitochondrien der Ratten[99] und Schweineleber[156] sowie in Vogelerythrocyten[201], danach aber auch in Mikroorganismen[157] gefunden wurde.

III. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Obwohl grundlegende Kenntnisse über Biosynthese und Funktion der Tetrapyrrole an Warmblüterzellen erarbeitet werden konnten[173], ist der tierische Organismus für exakte Regulationsstudien der Synthese weniger geeignet, da dort die Synthese in bestimmten Organen konzentriert ist und oft, wie bei Abfall des Sauerstoffpartialdruckes, über zwischengeschaltete Regelglieder[98] auf die Änderung eines äußeren Parameters reagiert.

Daher boten sich hierfür als ideale Objekte die Prokaryonten an, nachdem LASCELLES[103] an dem phototrophen Bakterium Rhodopseudomonas spheroides gezeigt hatte, daß die Synthese von Häm und Bakteriochlorophyll auch in der Bakterienzelle über die gleichen Vorstufen verläuft. Mit dieser und anderen phototrophen Bakterienspezies wurden darauf umfangreiche Untersuchungen hinsichtlich der Regulation der Tetrapyrrolsynthese vorgenommen[50,109], wobei Einflüsse von Substraten und Coenzymen, von Eisen und anderen Spurenelementen, sowie des Sauerstoffangebotes und der Belichtung untersucht wurden.

Dagegen ist bisher wenig über Synthese und Regulation in nicht zur Photosynthese befähigten Bakterien bekannt[17,87,155]. Achromobacter metalcaligenes, ein Vertreter der Diplococcus-mucosus-Gruppe, fiel dadurch auf, daß in seinem Kulturmedium Hämophilus influenzae wuchs[116,118]. Bei diesem "Wuchsfaktor" (vgl. GRANICK und GILDER[67]), der auch von anderen heterotrophen Arten in die Kulturflüssigkeit abgegeben wird, handelt es sich, wie DOSS und MANNHEIM[40] zeigten, um Protoporphyrin und Häm, die besonders bei Inkubation mit exogener δ-Aminolävulinsäure freigesetzt werden und somit das Wachstum von Hämophilus influenzae ermöglichen.

Aus Experimenten, die den Einfluß von einigen Substraten und Pharmaka auf die bakterielle Porphyrin- und Hämsynthese zum Inhalt hatten[30,38,95,120], ergab sich, daß Mikroorganismen zum Studium regulativer Faktoren in der Hämsynthese gut geeignet sind. Diese Ergebnisse regten die vorliegenden Untersuchungen

an, in denen die Tetrapyrrolsynthese dieses obligat aeroben, heterothrophen Organismus unter dem Einfluß physiologischer Parameter untersucht werden sollte.

Da Achromobacter metalcaligenes im Verteilungsmuster der gebildeten Porphyrine sowie in der Regulation der Synthese deutliche Abweichungen von den bisher an anderen Spezies beschriebenen Ergebnissen aufwies, wurden zum Vergleich Escherichia coli und Pseudomonas aeruginosa herangezogen. Bei den Untersuchungen zum Einfluß des Eisens auf die Tetrapyrrolsynthese wurden außerdem vergleichende Experimente mit dem phototrophen Bakterium Rhodopseudomonas spheroides durchgeführt.

Diese vergleichenden Untersuchungen sollten ermöglichen, etwas umfassendere und allgemeinere Aussagen über die Regulation der Hämsynthese in heterotrophen Bakterien zu machen.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Mikrobiologischer Teil

a) Testkeime

Für die Untersuchungen wurden die folgenden vier Spezies herangezogen:
Achromobacter metalcaligenes, Stamm Nr.661/60 HIH (Hygiene-Institut Heidelberg) (vgl.STENZEL und MANNHEIM[184]) wurde freundlicherweise von Herrn Prof.Dr.W.Mannheim, Hygiene-Institut der Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.
Pseudomonas aeruginosa, Stamm Nr. A 7244 übermittelte uns dankenswerterweise Herr Dr.H.-P.Kleber, Sektion Biowissenschaften und Biochemie der Universität Leipzig.
Escherichia coli, Stamm Nr.9001 wurde von der National Collection of Type Cultures (NCTC), London, bezogen.
Rhodopseudomonas spheroides, Stamm Nr.17023 (vgl.VAN NIEL[146]) lieferte die American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.
Die Stämme wurden auf Trypticase Soy Agar (Difco Nr.0369-01) bei 4° C gehalten und in Abständen von 20 Tagen überimpft.

b) Medien

Als komplexes Medium wurde eine Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung (Tryptone Soya Broth-TSB, OXOID CM 129) verwandt. Das Granulat wurde in destilliertem Wasser gelöst (30 g/l), und die Lösung 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.
Die Mediumbasis der definierten Medien (cf.KAUFMANN[94]) bestand aus: NaCl 86 mM, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,81 mM, $(NH_4)\ H_2PO_4$ 8,7 mM, K_2HPO_4 5,7 mM, $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ 0,5 µM. Sie wurde 20 Minuten bei 121° C autoklaviert.
Als Substrate wurden zugesetzt: L-Alanin (Fluka AG 05130), Glycin (Fluka 50050), L-Glutaminsäure (Fluka AG 49450), L-Glutamin (Fluka AG 49420), Athanol (Merck AG 972), Glycerin (Merck AG 4094), Natriumacetat (Merck AG 6267), Natriumpyruvat (Boehringer 15685 SPAD), Natrium-L-Lactat (Serva 29763), Natrium-DL-Lactat (Roth 3664920), Natriumsuccinat (Serva 14972), Natriumfumarat (Fluka

AG 47970), Oxalessigsäure (Roth 2-75660), DL-Äpfelsäure (Merck AG 382), Natriumcitrat (Merck AG 6436), Natrium-DL-isocitrat (Serva 26650), α-Ketoglutarsäure (Boehringer KG 15673).

Die Amino- und Keto-bezw.Hydroxysäuren, die nicht als Salze vorlagen, wurden mit NaOH in ihre Natriumsalze überführt. Alle Substanzen wurden in Natrium-Kaliumphosphatpuffer nach Sörensen 0.067 M gelöst und diese Stammlösungen auf pH 7,0 eingestellt. Die Lösungen wurden mittels Filtration durch SCHOTT G5m Glasfritten oder durch MILLIPORE-Filter (GSWP 01300) sterilisiert und bei 4° C aufbewahrt.
In einigen Versuchen wurden dem definierten Medium außerdem folgende Substanzen zugesetzt: δ-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (Fluka AG 08340), Eisen-III-citrat (Merck AG 5513), o-Phenanthrolin (Fluka 77500), Puromycin (Serva 33835). Die Substanzen wurden in 0,067 M Natrium-Kaliumphosphatpuffer gelöst, die Lösungen auf pH 7,0 eingestellt und mittels Filtration durch MILLIPORE-Filter (GSWP 01300) sterilisiert. Diese Stammlösungen wurden bei -20° C gelagert.

c) Kultivierung

Für Untersuchungen an wachsenden Kulturen wurden zunächst in 100 ml Erlenmeyerkolben Vorkulturen mit 20 ml des definierten Mediums, das Natrium-L-Lactat in einer Endkonzentration von 40mM enthielt, angelegt und für 15 Stunden bei 37° C inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurde die Einsaat für die Syntheseexperimente so bemessen, daß sie bei 2-5μg Trockengewicht/ml Kulturvolumen lag. Die Produktionssysteme wurden mit 150 ml Medium, in dem die jeweils gewünschten Substrate enthalten waren, in 500 ml Erlenmeyerkolben angesetzt. Die Kolben wurden mit Stanniolfolie verschlossen.
Die Kulturen wurden zunächst 2 Stunden statisch und danach 30 Stunden oder in einigen Fällen auch länger in einem horizontal oszillierenden Schüttelinkubator (Amplitude 70 mm, Frequenz 60/Min.) bei 37° C inkubiert. Nach 20 Stunden trat das Wachstum der Zellen in die spätlogarithmische Phase.
In gleicher Weise wurden auch einige wachsende Kulturen im komplexen Medium inkubiert, wobei Vor- und Hauptkulturen TSB-Medium in den oben beschriebenen Mengen enthielten.

Abweichend hiervon wurden die Kulturen von Rhodopseudomonas spheroides ausschließlich statisch bei 32° C für 50 Stunden inkubiert. Zur Ermittlung einer optimalen δ -Aminolävulinsäurekonzentration für die Syntheseexperimente aus exogener δ -Aminolävulinsäure wurden 5 ml-Kulturen in Röhrchen (180 x 16 mm) mit definiertem Medium und der gleichen Einsaat (s.o.) angesetzt. Die Röhrchen wurden in einer Schräglage von 10° zuerst zwei Stunden statisch und darauf 25 Stunden im Schüttelinkubator bei 37° C inkubiert.

Für die Versuche mit resuspendierten Kulturen wurden in 2 l-Fernbachkolben mit je 450 ml komplexen Medium Zellen für 2 Stunden statisch und darauf für 18 Stunden im Schüttelinkubator angezüchtet und nach schonender Sedimentation (6000 x g, 30 min, 5° C) und Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung im jeweiligen definierten Medium zu einer Dichte von 0,8 bis 1,4 mg/ml (vgl.LASCELLES[103]) suspendiert. Von dieser Suspension wurden je 30 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und 32 Stunden im Schüttelinkubator bei 37° C inkubiert.

Das Wachstum einer Kultur und die Keimdichte, die zur Beimpfung der Inkubationsansätze erforderlich war, wurden turbimetrisch bestimmt (vgl.MIE[130]). Für die vier in Gestalt und Größe von einander abweichenden Spezies wurden die individuellen Beziehungen zwischen Trockengewicht und Transmission bei 578 nm, gemessen gegen das unbeimpfte Medium, ermittelt. Hierbei wurden in Anlehnung an MONOD[131] unter identischen Bedingungen stets Zellen aus maximal stationären Kulturen eingesetzt. Die Messung erfolgte unter Verwendung zylindrischer Kulturgefäße von 13 mm Lumen, die untereinander Abweichungen der optischen Durchlässigkeit von weniger als 1% aufwiesen, mit dem Spezialküvettenhalter 115320 im Photometer Eppendorf 1101.

Um die Lebensfähigkeit von mit Puromycinzusätzen inkubierten Zellen nach deren Überführung auf einen normalen Nährboden zu ermitteln, wurde ein einfacher Test in Anlehnung an Methoden von POSTGATE et al.[159,160] und POWELL[161] durchgeführt. Eine Probe der mit Puromycin inkubierten Suspension wurde mit physio-

logischer Kochsalzlösung auf $1:10^{-8}$ verdünnt und 0,1 ml der letzten Verdünnungsstufe auf ein MILLIPORE-Filter (GSWP 04780) gebracht und verteilt. Das Filter wurde auf eine Trypticase Soy Agarplatte aufgelegt und diese 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Anfärbung mit Methylenblau wurden die Kolonien bei schräger Beleuchtung unter der Lupe ausgezählt und ihre Zahl zu der Koloniezahl nicht mit Puromycin inkubierter Zellen, die in gleicher Weise als Standard mitgeführt wurden, in Beziehung gesetzt.

d) Aufarbeiten der Kulturen

Für die Analyse aus Gesamtkulturen wurde die Suspension mit Essigsäure (96%) auf pH 4 eingestellt. Für 10 ml Medium wurden 0,4 g Talk zugesetzt, an den die Tetrapyrrole des Mediums und die Zellen adsorbiert wurden. Der Talk wurde sedimentiert (10 000 x g, 15 min, 5° C) und lyophilisiert.

Für die getrennte Analyse aus Zellen und Überständen wurden die Zellen sedimentiert (20 000 x g, 15 min, 5°C) und lyophilisiert. Porphyrine und Protohämin des Überstandes wurden bei pH 4 an Talk adsorbiert, sedimentiert und lyophilisiert.

Das Material wurde anschließend sofort bei -25° C eingefroren und bei positivem Ergebnis der mikroskopischen und kulturellen Sterilitätskontrollen der weiteren Verarbeitung zugeführt.

II. Chemischer Teil

a) Reagentien

Methanol-H_2SO_4 5%(v/v), $NaHCO_3$, Na_2SO_4 wasserfrei, Benzol, Äthylacetat, n-Butanol, Methanol, Chloroform, Petroläther Siedebereich 40-60° C, Diäthyläther, Pyridin, NaOH 0,1 N, $Na_2S_2O_4$, $K_3Fe(CH)_6$, Natriumacetatlösungen 3N und 0,5 N, HCl 1N, Trichloressigsäure 5%(w/v), Acetylaceton, Trispuffer 0,04 M (pH 7,4) (p.a. Reagentien Merck AG).
Kupfer(II)acetat-Lösung 0,2% (w/v) in Chloroform-Methanol (1:1), Ehrlichs-Hg-Reagenz (Dimethylaminobenzaldehyd 2g, $HgCl_2$ 0,35 g, Essigsäure (96%) 84 ml, Perchlorsäure (70%) 20 ml, H_2O ad 110 ml) Biuret-Reagenz[21].
Kieselgel-Fertigplatten für Dünnschichtchromatographie (Schichtdicke 0,25 mm, Merck AG 5729), Ionenaustauscherharze DOWEX 2 X 8 (200-400 mesh) und DOWEX 50W X 8(50-100 mesh)(SERVA).

b) Vergleichssubstanzen

Protohämin IX (Fluka AG), Protoporphyrin IX (Buchs SG, Schweiz), Koproporphyrin-III-tetramethylester aus Normalurin, Uroporphyrin-III-oktamethylester aus porphyrischem Urin[42]. Als Eiweißstandard diente LABTROL (Asid-Institut, München).

c) Apparate

Hochvakuumpumpe (Pfeiffer BD 4), Rotationsverdampfer ("Rotavapor" Büchi, Schweiz), UV-Lampe 355 nm (DESAGA-Intensivstrahler 131000), Photometer Eppendorf 1101, Spektralphotometer Beckman DB-G mit 10''-Kompensationsschreiber, Spektralphotometer Hitachi EPS-3T mit Einrichtung für diffuse Reflexion (Ulbricht-Kugel) 123-3030, Turner Fluorometer 111 mit Spezial-Photomultiplier für gesteigerte Rot-Empfindlichkeit (HTV-R 136), ausgerüstet mit Camag TCL-Scanner und verbunden mit Hitachi-Schreiber OPD-33 10 mV.

d) Methoden

1. Isolierung und Bestimmung von Porphyrinen und Häm[26].

1.1. Veresterung der Tetrapyrrole

Das lyophilisierte Material wurde mit Methanol-H_2SO_4 versetzt und in verdunkelten Gefäßen 10 bis 12 Stunden bei 20° C gehalten. Unter diesen Bedingungen werden freie Porphyrine in Porphyrinmethylester und Protohämin in Hämin-Methylester quantitativ überführt[42].

1.2. Extraktion der Tetrapyrrolmethylester

Die veresterten Proben wurden mit Chloroform versetzt und das Gemisch durch ein Faltenfilter in ein Extraktionsgefäß überführt. Mit Chloroform-Methanol (4:1) wurde das Veresterungsgefäß zweimal nachgespült und diese Lösung ebenfalls durch das Filter in das Extraktionsgefäß (je nach Menge verschließbare Schliffröhrchen (190 x 20 mm, NS 14.5) oder Schütteltrichter 100 ml) überführt.
Nach Zusatz von destilliertem Wasser und kräftigem Schütteln wurde die Chloroformphase in ein Sammelgefäß gebracht. Hieran schlossen sich noch drei weitere Extraktionen mit Chloroform an, das mit der ersten Chloroformphase vereinigt wurde. Wie das Verschwinden der Rotfluorreszenz im UV-Licht nach der zweiten oder dritten Extraktion zeigte, waren damit die Porphyrinmethylester quantitativ in die Chloroformphase übergegangen. Bei Material aus Kulturen, denen δ-Aminolävulinsäure zugesetzt worden war, wurde die Anzahl der Extraktionen vom Fluoreszenznachweis abhängig gemacht. In der Regel kam man hier mit fünf bis sechs Extraktionen aus.
Der organische Extrakt wurde einmal mit halbgesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und zwei- bis dreimal mit Aqua dest. gewaschen, bis das pH der Waschphase neutral war. Die abgetrennte Chloroformphase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, in ein Spitzkölbchen überführt und eingedampft. Das Sammelgefäß und das darin verbliebene Na_2SO_4 wurden zweimal mit warmen Chloroform gespült, das in das gleiche Kölbchen gegeben wurde.

1.3. Dünnschichtchromatographie[163,182]

Der mit etwa 0,25 ml $CHCl_3$ wieder gelöste Tetrapyrrol-Methylester-Extrakt einer Probe wurde auf eine Dünnschicht-Kieselgel-Fertigplatte in Form eines etwa 3 cm breiten Streifens quantitativ aufgetragen. So konnten auf einer 20 x 20 cm großen Platte, die in der Mitte Vergleichssubstanzen führte, vier Proben appliziert werden. Die verwendeten Platten waren vorher nacheinander in den Lösungsmittelsystemen Chloroform-Methanol (2:1, v/v) und Benzol-Äthylacetat (4:1, v/v) bis an den oberen Plattenrand vorgelaufen, um Verunreinigungen zu eliminieren. Sie wurden anschließend im Trockenschrank (90° C, 30 min) wieder aktiviert. Das Vorlaufen der Platten bewährte sich, um eine photometrisch leerwertfreie Analyse der vom Adsorbens eluierten Methylester zu erhalten. Das Chromatogramm wurde nun in den folgenden Lösungsmittelsystemen stufenweise entwickelt:

a) Chloroform-Methanol (130:20, v/v), dreimal 2 cm; an der Lösungsmittelfront bildete sich eine neue Startzone der Porphyrin-Methylester.

b) Petroläther-Diäthyläther (4:1, v/v), 16 cm.

c) Benzol-Äthylacetat-Methanol (85:13,5:1,5, v/v), 12 cm.

d) Chloroform-Methanol (100:5, v/v), dreimal 3 cm.

Nach jedem Lauf wurden die Platten mit einem Kaltluftföhn vollständig getrocknet.

Im Lösungsmittelsystem b) laufen Lipoide (Cholesterinester, Triglyceride, Fettsäuremethylester), die aus Membranen stammten oder ins Medium abgegeben wurden[40], nahe der Front. Die Fettsäuremethylester entstanden unter unseren Bedingungen durch säurekatalysierte Umesterung von Glycerophosphatiden und Triglyceriden[39]. Im Lösungssystem c) trennten sich die Porphyrin-Methylester vollständig, mit dem System d) wurde Hämin-Methylester herausfraktioniert. Die Porphyrin-Methylester konnten durch ihre charakteristische Rotfluoreszenz unter dem UV-Licht und Protohämin-Methylester als dunkelbraune Zone erkannt werden. Sie wurden im Vergleich zu den mitgelaufenen Testsubstanzen markiert. Die Nachweisempfindlichkeit der Porphyrine im langwelligen Licht wird stark von der Qualität der UV-Lampe beeinflußt. Mit dem verwendeten Gerät (DESAGA-Intensivstrah-

ler, Hochdruckbrenner, blaues Glas) konnten auf dem lösungsmittelfeuchten Chromatogramm auf einer Fläche von 10 mm^2 noch 2 ng Porphyrin-Methylester nachgewiesen werden. Die markierten Kieselgelzonen wurden mit einem Skalpell abgelöst, in ein Faltenfilter übertragen und eluiert, wobei für die Porphyrin-Methylester Chloroform-Methanol (9:1, v/v) 35°C) und für Hämin-Methylester Chloroform-Methanol (4:1, v/v, 50°C) verwandt wurden. Die Lösungsmittel wurden durch Vakuumdestillation entfernt.

1.4. Spektrophotometrische Analyse

Die Porphyrinmethylester wurden entweder in Chloroform[32] oder als Kupferchelate[28] spektophotometrisch gemessen. Protohämin-di-methylester wurde als Pyridinhämochromogen im Differenzspektrum (reduziert minus oxydiert) bestimmt[29].

1.5. Fluorometrische Auswertung der Chromatogramme

Die Extrakte aus den 5 ml-Kulturen wurden mit Mikropipetten (Camag) quantitativ auf die Dünnschicht-Platte appliziert. Die damit entstehenden schmalen Banden der Porphyrinmethylester wurden bei der fluorometrischen Auswertung in ganzer Breite erfaßt, so daß eine exakte Bestimmung dieser kleinen Porphyrinmengen möglich war[34,36].
Zur Dokumentation und einer halbquantitativen Protokollierung der Befunde wurde auch die Fluoreszenzintensität von Chromatogrammen registriert, bei denen die Substanzzonen breiter als der das Anregungslicht begrenzende Spalt waren[46].

1.6. Photographische Dokumentation
Die entwickelten Platten wurden im UV-Licht photographiert[190].

1.7. Spektrophotometrische Analyse von Cytochromen in intakten Zellen

Hierzu wurden in physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Zellen zu einer Dichte von 10 mg/ml suspendiert. Das Differenz-

spektrum der Cytochrome (reduziert minus oxydiert) wurde nach PAUL[153] im Hitachi-Spektralphotometer EPS 3T ermittelt.

2. Isolierung und Bestimmung von δ - Aminolävulinsäure und Porphobilinogen

2.1. Aufschluß der Zellen

Abgewogene Mengen von lyophilisierten Zellen wurden zerrieben und für 12 Stunden bei 4° C in Diäthyläther gebracht. Nach Abdampfen des Äthers wurden 2 ml Aqua dest. und 1 ml Trichloressigsäure (5%) zugegeben und die Proben unter reichlichem Nachspülen mit Aqua dest. nach 30 Min. durch ein Faltenfilter filtriert.

2.2. Säulenchromatographische Trennung und spektophotometrische Analyse[25,127]

Für die Analyse von δ -Aminolävulinsäure (ALS) verwandten wir DOWEX-Ionenaustauscherharz 50 X 8 (50-100 mesh) und für Porphobilinogen (PBG) DOWEX-Ionenaustauscherharz 2 X 8 (200-400 mesh). Das Harz wurde in Glassäulen (Durchmesser 150 mm) in einer Höhe von 3 cm eingebracht. Die Austauschersäulen wurden übereinander montiert, so daß das Eluat der PBG-Säule in die ALS-Säule fliessen konnte. Das Filtrat jeder Probe wurde zuerst auf die PBG-Säule gebracht und tropfte von dort in die ALS-Säule. Nachdem mit ca. 15 ml Aqua dest. nachgespült worden war, wurden die Säulen getrennt und die adsorbierten Derivate einzeln eluiert.
PBG wurde mit 2 ml 1 N und anschließend mit 2 ml 0,2 N Essigsäure eluiert. Das Eluat wurde in 10 ml-Meßkölbchen aufgefangen, die mit 0,2 N Essigsäure aufgefüllt wurden.
ALS wurde in drei aufeinanderfolgenden Arbeitsgängen mit je 9 ml 0,5 N Natriumacetat eluiert und die Eluate in drei 10 ml-Meßkölbchen aufgefangen, die mit 0,5 N Natriumacetat bis zur Eichmarke aufgefüllt wurden.
Je 2 ml der drei ALS-Fraktionen wurden mit 0,1 ml Acetylaceton versetzt und 10 Min. auf 100° C erhitzt, wobei sich ein 2-Methyl-3-acetyl-4-(3-propionsäure)pyrrol bildete.

Zu jeder dieser zyklisierten Proben und zu 2 ml des PBG-Eluates wurden 2 ml Ehrlichs-Hg-Reagens gegeben und nach 15 Min. die Extinktion des Farbkomplexes gegen einen gleichbehandelten Leerwert bei 552 nm gemessen. Zur Berechnung dienten die von SCHLENKER et al.[170] angegebenen Faktoren.

3. Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität

3.1. Herstellung eines zellfreien Extraktes[30]

Die sedimentierten Zellen der resuspendierten Kulturen wurden in 0,067 N Natrium-Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation in Trispuffer (o,o4 M, pH 7,4) zu einer Dichte von 20 mg/ml suspendiert.
Die Desintegration erfolgte mit dem Zellhomogenisator MSK (B.BRAUN-Apparatebau Melsungen), wobei Glasperlen von 0,17-0,18 mm Durchmesser gegen die Bakteriensuspension für 3 Min. mit einer Frequenz von 4000 min^{-1} unter CO_2-Kühlung geschüttelt wurden.Nach Sedimentation von Membranen und noch intakten Zellen (20000 x g, 0° C, 10 min) wurde der Eiweißgehalt des Überstandes mit der Biuret-Methode bestimmt, wobei LABTROL als Eiweißstandard diente.
Sämtliche beschriebenen Arbeiten wurden in einem Eisbad durchgeführt, die Zentrifugation erfolgte in einem auf 0° C vorgekühlten Rotor.

3.2. Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivitätsbestimmung der Lactat-Dehydrogenase erfolgte nach der Methode von BERGMEYER und BERNT[4] mit Pyruvat und NADH. Der Eiweißgehalt wurde so eingestellt, daß er stets bei 1,5 g% lag. Falls die vorgeschriebene Temperatur nicht genau eingehalten werden konnte, wurden die von der BOEHRINGER-MANNHEIM-CORPORATION[5] angegebenen Temperaturfaktoren berücksicht.

C. ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

Die Variabilität der Analysendaten zwischen den einzelnen Versuchsreihen beruht auf Schwankungen bezüglich Dichte, Alter und physiologischer Leistung der Zellen einer Kultur. Synchronisierte Systeme standen nicht zur Verfügung. In Tabellen und Abbildungen werden repräsentative Beispiele einer Versuchsserie dargestellt.

Achromobacter metalcaligenes ist in der Lage, sämtliche bekannten Porphyrine zu synthetisieren. Aus den an intakten Zellen gewonnenen Differenzspektren (reduziert minus oxydiert) geht hervor, daß unter unseren Versuchsbedingungen vorwiegend Cytochrom b gebildet wird (Abb.13).

Neben den bekannten Porphyrinen trat bei allen vier Organismen regelmäßig ein Porphyrin mit drei Carboxylgruppen auf, dessen Methylester bei der Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms zwischen den Estern von Kopro- und Protoporphyrin wanderte.

Nach längerdauernder Inkubation mit hohen Konzentrationen exogener ε-Aminolävulinsäure fanden sich in den Zellen der drei heterotrophen Spezies in geringen Mengen Zink-Chelate von Kopro- und Uroporphyrin. Diese Substanzen konnten schon auf dem Dünnschichtchromatogramm an ihrer typischen orangeroten Fluoreszenz und an ihren R_F-Werten, die immer etwas niedriger als die der jeweiligen reinen Porphyrinmethylester waren, erkannt werden[37].

I. Vergleich der Synthese von Porphyrinen und Protohämin in wachsenden Kulturen von E.coli, Ps.aeruginosa und A.metalcaligenes

Die drei Organismen wurden in einem definierten Medium mit Natrium-L-Lactat (mM) als Energiequelle unter identischen Bedingungen 40 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert. In einer parallel geführten Versuchserie enthielt das Medium zusätzlich δ-Aminolävulinsäure in einer Konzentration von 0,3 mM.

Wie schon aus dem fluoreszenzoptischen Nachweis und einem Vergleich der registrierten Fluoreszenzintensitäten der getrennten Fraktionen auf dem Dünnschichtchromatogramm hervorgeht (Abb.2-4), erreicht bei der Synthese aus Lactat Ps.aeruginosa drei- bis vierfach höhere Porphyrinkonzentrationen als E.coli und A.metalcaligenes. Die höchsten Konzentrationen an Protohämin bei Synthese aus Lactat bildete A.metalcaligenes. Der Hämgehalt von E.coli bewegte sich stets in einem mittleren Bereich, während Ps.aeruginosa in allen Inkubationsansätzen die geringsten Konzentrationen aufwies. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von LASCELLES[103,108] an phototrophen Bakterien stellte Koproporphyrin bei E.coli (ca 52%) und Ps.aeruginosa (ca 65%) die größte Porphyrinfraktion dar (Tab.2). Dagegen war es überraschend, daß bei A.metalcaligenes Koproporphyrin mit nur etwa 22% auftrat, während Protoporphyrin mit etwa 50% in allen Kulturen vorlag.

Anmerkungen zu den fluorometrischen Registrierungen (Abb.2,3,4,12)
Bezeichnungen: U = Uro-, 7 = Hexacarboxy-, 5 = Pentacarboxy-, K = Kopro-, 3 = Tricarboxy-, P = Protoporphyrinmethylester; H = Protohäminmethylester; F = Frontpeak.
Meßapparatur: Turner Fluorometer 111 mit Spezial-Photomultiplier HTV-R 136, ausgerüstet mit Carmag TLC-Scanner und verbunden mit Hitachi Recorder QPD-33, 10 mV.
Meßbedingungen: Lampe 110-853, Primärfilter 813, Sekundärfilter 820, Blendeneinstellung 30, Spaltbreite 2,5. Geschwindigkeit des TCL-Scanners 2 cm/min.

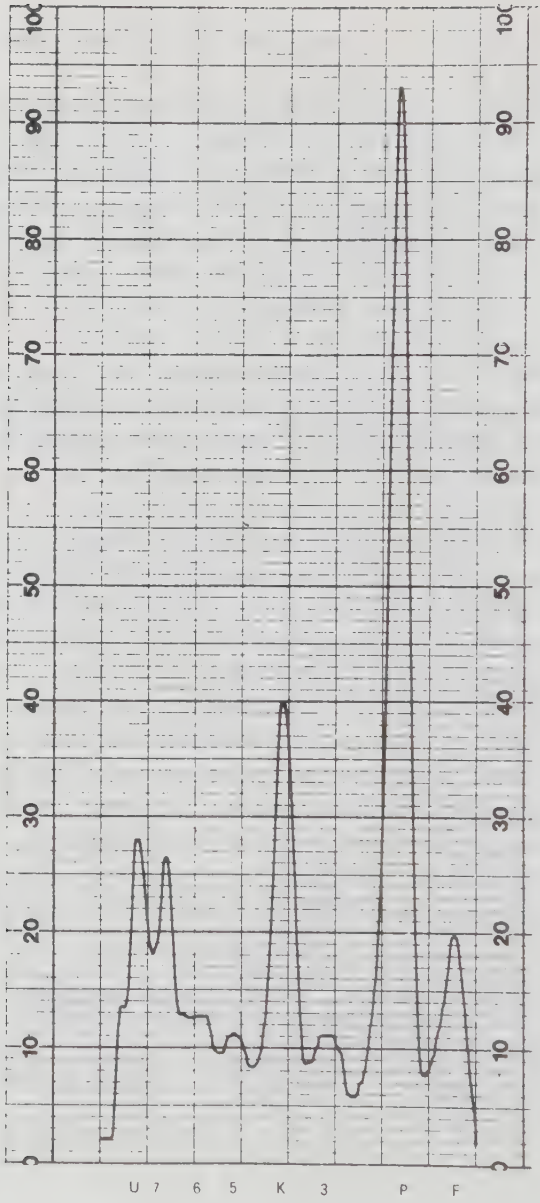

Abb. 2. Fluorometrische Registrierung eines Dünnschichtchromatogramms mit Porphyrinmethylestern dargestellt aus in Lactat-Medium (40 mM) inkubierten Zellen von E. coli (Bezeichnung und Meßapparatur vgl. S. 19).

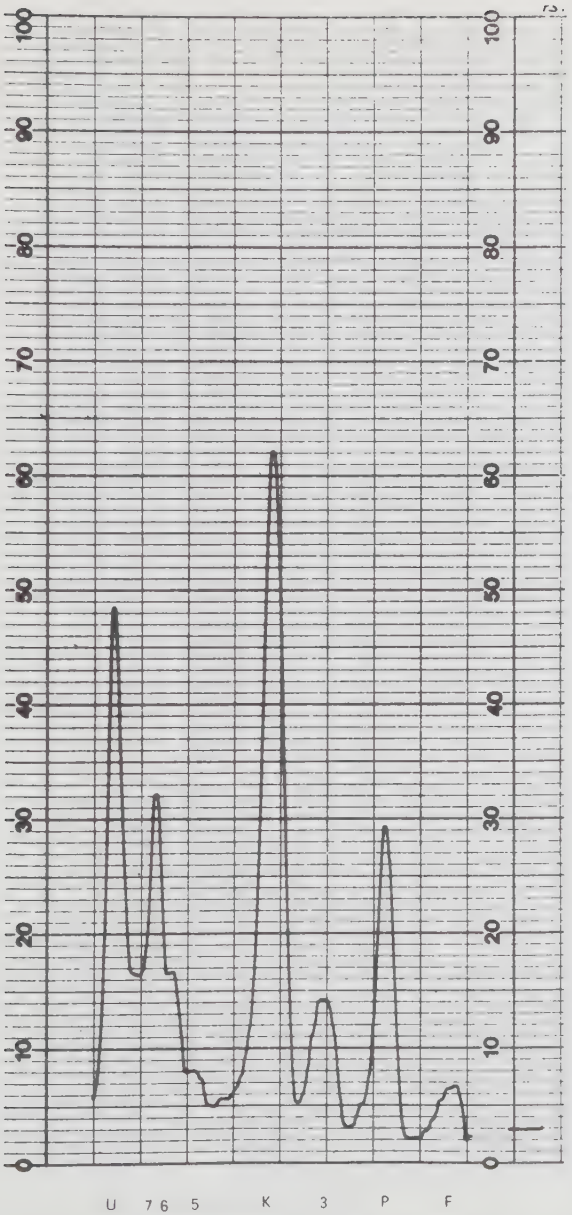

Abb. 3. Fluorometrische Registrierung eines Dünnschichtchromatogramms mit Porphyrinmethylestern dargestellt aus in Lactat-Medium (40 mM) inkubierten Zellen von Ps. aeruginosa. Nur der fünfte Teil des Extraktes wurde aufgetragen (Bezeichnung und Meßapparatur vgl. S. 19).

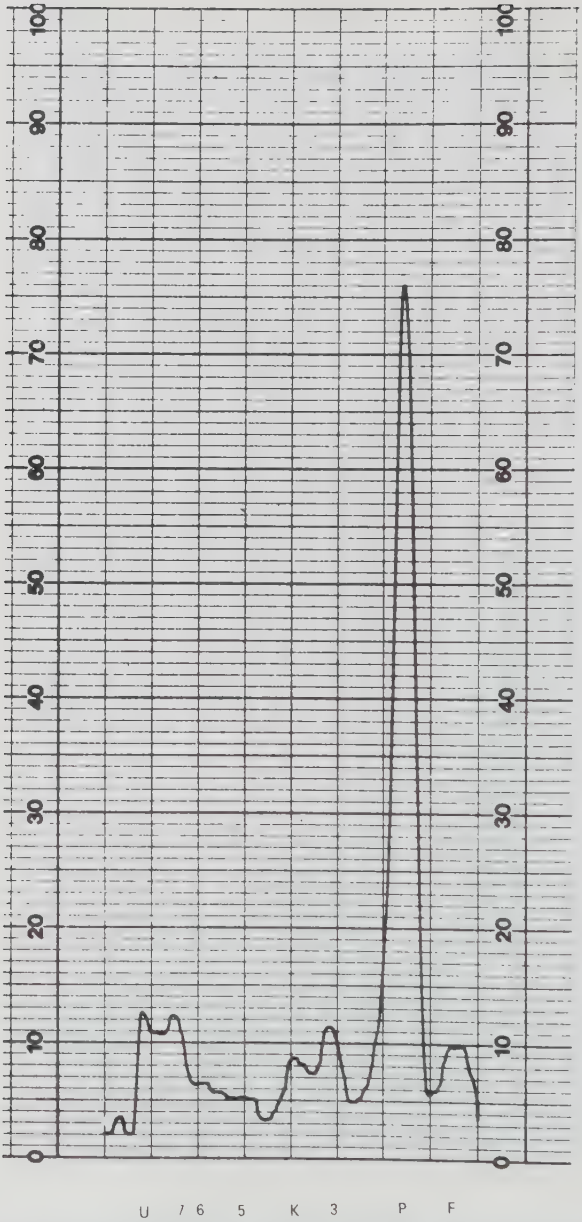

Abb. 4. Fluorometrische Registrierung eines Dünnschichtchromatogramms mit Porphyrinmethylestern dargestellt aus in Lactat-Medium (40 mM) inkubierten Zellen von A. metalcaligenes (Bezeichnung und Meßapparatur vgl. S. 19).

Der Zusatz exogener δ-Aminolävulinsäure steigerte die Syntheserate der Porphyrine bei E.coli um den Faktor 19, bei Ps.aeruginosa um den Faktor 13 und bei A.metalcaligenes um den Faktor 27. Ein Einfluß der exogenen δ-Aminolävulinsäure auf das Wachstum der Kulturen wurde nicht beobachtet.

Ps.aeruginosa bildet zwei- bis dreimal mehr Porphyrine als die beiden anderen Spezies (Tab.2). Wiederum wies A.metalcaligenes die höchste Syntheserate an Protohämin auf. Die Hämkonzentrationen von E.coli waren wiederum größer als die von Ps.aeruginosa.

Unter dem Einfluß der exogenen δ-Aminolävulinsäure wird besonders die Synthese der Porphyrine mit vier bis acht Carboxylgruppen forciert. In allen drei Spezies trat Uroporphyrin als stärkste und in E.coli und Ps.aeruginosa Koproporphyrin als zweitstärkste Fraktion auf. Lediglich bei A.metalcaligenes waren etwa gleichgroße Kopro- und Protoporphyrinkonzentrationen zu finden. Auch im Verteilungsmuster der anderen Porphyrine ließen sich weitgehende Übereinstimmungen finden, wie z.B. in der exessiven Anhäufung von Heptacarboxyporphyrin. Die in den Zellen gefundenen Zink-Chelate des Uro- und Koproporphyrins sind in Tab.1 aufgeführt.

Wie auch LASCELLES[108] zeigte, setzt bei Inkubation in Medien ohne zusätzliche Eisengaben eine erhebliche Porphyrinsynthese bei limitierten Hämkonzentrationen ein. Augenscheinlich sind hierfür schon die Eisenspuren in den Chemikalien ausreichend. Das regelmäßige Auftreten von Hepta-, Hexa- und Pentacarboxyporphyrinen legt nahe, daß die Uroporphyrinogen-Decarboxylase offenbar aus mehreren Enzymen besteht, die an verschiedenen Stufen des Decarboxylierungsprozesses eingreifen[165]. Auf Grund der regelmäßigen quantitierenden Variationen, mit denen diese Intermediärprodukte erscheinen, was auch in Urinen von Patienten mit hepatischen Porphyrien beobachtet wurde[33,35], kann man annehmen, daß jede der vier Synthesestufen von einer spezifischen Decarboxylase katalysiert wird.

Tab. 1. Porphyrin-Zink-Chelate in Zellen von E. coli (1), Ps. aeruginosa (2) und A. metalcaligenes (3) nach einer Inkubationsdauer von 40 Std. mit Zusatz von δ-Aminolävulinsäure (0,3 mM).

Spezies	Porphyrin-Zink-Chelat	SORET-Maximum (nm)	Konzentration (pMol/mg)
1	Kopro	410	1,3
	Uro	415,5	4,8
2	Kopro	409,5	5,3
	Uro	415	8,7
3	Uro	415	4,4

Während der Befund, daß Koproporphyrin bei E.coli und Ps.aeruginosa die weitaus größte Porphyrinfraktion darstellt, gut mit bisherigen Ergebnissen bei Bakterien [108] und Hefen[55] übereinstimmt, weicht das Porphyrinmuster bei A.metalcaligenes mit dem dominierenden Protoporphyrin hiervon deutlich ab. Auch durch die höheren Hämsyntheseraten unterscheidet sich dieser Organismus von den beiden anderen Spezies. Die bisherige Annahme, nach der bei phototrophen wie heterotrophen Bakterien eine weitgehend gleiche quantitative Ausstattung mit den an der Synthese beteiligten Enzymen angenommen wurde, muß wohl dahingehend modifiziert werden, daß bei allen Arten die gleichen Enzymsysteme vorhanden sind, welche aber mit unterschiedlichen - vermutlich genetisch fixierten - Aktivitäten und Konzentrationen in den einzelnen Spezies auftreten. Wie spätere Versuche zeigen, modifiziert diese "artspezifische", quantitative Enzymausstattung auch in typischer Weise den Einfluß des Eisens auf die Tetrapyrrolsynthese.

Tab. 2. Synthese von Porphyrinen und Häm aus endogener und exogener δ-Aminolävulinsäure (ALS) in E. coli (1), Ps. aeruginosa (2) und A. metalcaligenes (3).

Spezies	Zusatz von ALS	Häm	Gesamt - porphyrine	Prozentuale Verteilung der Porphyrine						
		----(pMol/mg)----		Uro	7 COOH	6 COOH	5 COOH	Kopro	3 COOH	Proto
1	-	18,7	38,6	8,7	3,6	1,3	2,3	52,0	8,1	24,0
	+	61,9	724,5	43,2	12,2	4,3	7,7	21,5	8,6	11,6
2	-	10,5	141,5	6,1	3,5	1,6	14,8	65,0	4,3	4,7
	+	51,0	1822,5	61,0	8,1	3,5	8,3	14,2	2,5	2,4
3	-	24,7	26,2	8,0	5,0	1,2	2,5	22,1	15,3	45,9
	+	79,2	707,8	35,8	12,8	4,6	9,7	14,2	8,3	14,6

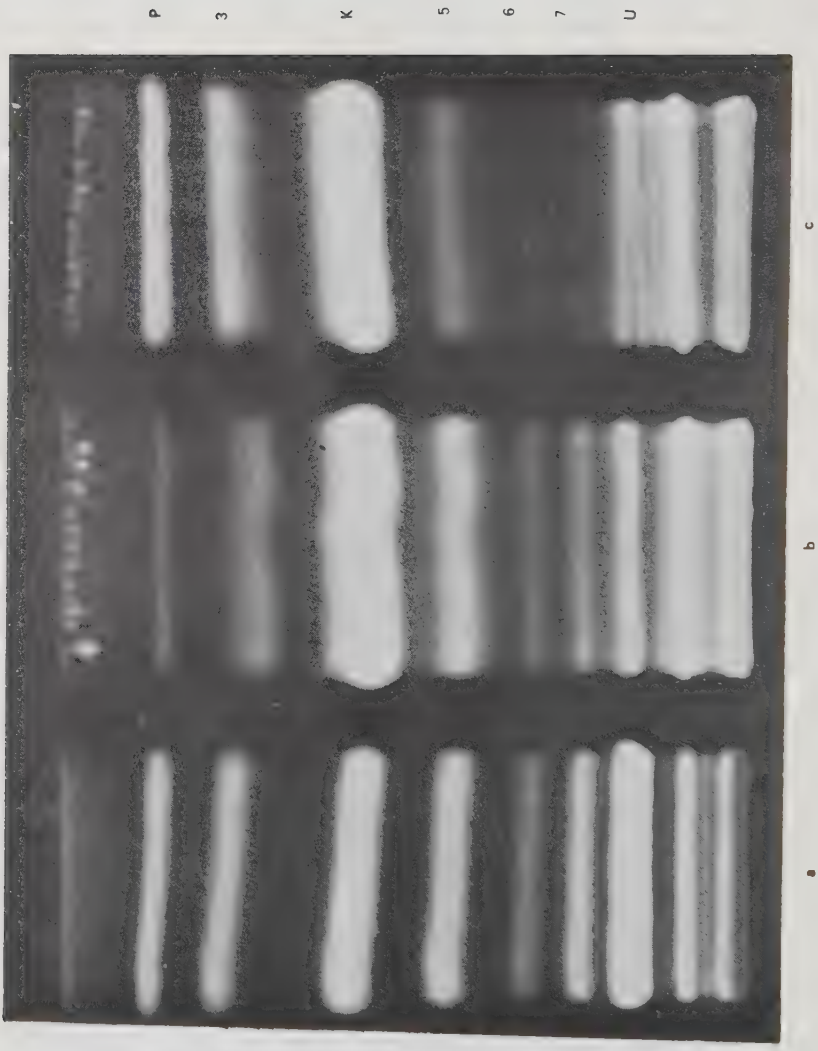

Abb. 5. Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm mit den Methylestern von Porphyrinen und Häm aus Zellen von E. coli (a), Ps. aeruginosa (b) und A. metalcaligenes (3) nach Inkubation in Lactat-Medium (40 mM) mit Zusatz von δ-Aminolävulinsäure (0,3 mM). H = Häm, U = Uro-, 7 = Heptacarboxy-, 6 = Hexacarboxy-, 5 = Pentacarboxy-, K = Kopro-, 3 = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

Das Auftreten extrem hoher Uroporphyrinkonzentrationen neben beachtlichen Anteilen von Heptacarboxyporphyrin bei Synthese aus exogener δ-Aminolävulinsäure weist erstaunliche Parallelen zu der Prophyrinverteilung in Urin[16,41] und Leberpunktaten [35] bei chronischen hepatischen Porphyrien auf.

Die regelmäßige Bildung von Porphyrin-Zink-Chelaten nach der Inkubation mit hohen δ-Aminolävulinsäurekonzentrationen legt die Vermutung nahe, daß in allen drei Spezies eine oder mehrere Zink-Chelatasen vorkommen, die auch in Hefezellen vermutet werden[162]. Allerdings wäre auch, begünstigt durch das hohe Porphyrinangebot, ein nichtenzymatischer Einbau des Zinks in das Porphyrinsystem denkbar, wie er für den Einbau des Eisens in Protoporphyrin ohne Enzymkatalyse beschrieben wurde[76].

II. Verteilung von Protohämin und Porphyrinen zwischen Zellen und Medium

Als einziges Porphyrin bei der Synthese aus Lactat scheiden A.metalcaligenes und E.coli Koproporphyrin aus, während Ps. aeruginosa außer Proto- und Hexacarboxyporphyrin auch alle anderen Porphyrine in das Kulturmedium abgibt. Von allen drei Spezies wird auch ein kleiner Anteil des Protohämins in das Medium emitiert (Tab.3).

Während der Inkubation aus zugesetzter δ-Aminolävulinsäure wurde von allen Keimen fast das gesamte Uroporphyrin sowie 75-90% der Prophyrine mit sieben bis vier Carboxylgruppen ausgeschieden. Der Anteil des emittierten Tricarboxyporphyrins betrug in allen Spezies etwa 50%, während etwa 25 bis 17% des Protoporphyrins ausgeschieden wurden. Die Exkretion von Häm war in allen Organismen etwas größer als bei Synthese aus Lactat.

In der Kulturflüssigkeit aller Organismen wurden kleine Mengen von Lipoiden nachgewiesen, die aber wegen fehlender Laborausrüstungen nicht weiter charakterisiert werden konnten.

Die stets zu beobachtende Ausscheidung geringer Protohäminkonzentrationen scheint bei der Biosynthese der bakteriellen Hämoproteine physiologisch zu sein und dürfte aus einer in biologischen Systemen niemals absolut exakten Koordination der Syntheseraten von prosthetischen Gruppen einerseits und den spezifischen Proteinen andererseits resultieren[13,50,91]. Unabhängig von der Syntheserate der einzelnen Spezies wird die Ausscheidung lediglich im Hinblick auf die Stabilisierung des osmotischen Druckes gesteuert, wobei augenscheinlich die höher carboxylierten Stufen bevorzugt werden.

Das regelmäßige Auftreten von Lipoiden im Kulturmedium legt nahe, daß die Tetrapyrrole an diese gekoppelt ausgeschieden werden.

Tab. 3. Porphyrin- und Hämausscheidung von E. coli (1), Ps. aeruginosa (2) und A. metalcaligenes (3).

Spezies	Zusatz von ALS	Häm	Gesamt - porphyrine	Anteil der Einzelfraktionen Uro	7 COOH	6 COOH	5 COOH	Kopro	3 COOH	Proto
		Prozentualer Anteil der Tetrapyrrole im Kulturmedium								
1	-	15,4	17,8	-	-	-	-	73,2	-	-
	+	29,1	71,2	91,7	76,4	77,9	76,4	86,8	49,3	24,3
2	-	16,4	58,4	66,4	38,5	-	75,4	88,2	43,2	-
	+	27,5	89,3	96,4	86,4	87,8	85,3	89,7	53,5	16,7
3	-	18,5	16,3	-	-	-	-	70,7	-	-
	+	26,7	69,8	91,6	73,8	78,5	76,9	84,3	50,7	24,5

Analoge Verteilungen der Porphyrine zwischen Zellen und Medium fand DOSS[31] in Leberzellkulturen. Auch der menschliche Organismus scheidet unter physiologischen Bedingungen überwiegend Koproporphyrin neben kleinen Anteilen höher carboxylierter Vorläufer aus[63].

III. Porphyrin- und Hämsynthese im zeitlichen Verlauf der Inkubation bei A.metalcaligenes

Für diese Untersuchungen wurden die Zellen im definierten Medium mit Natrium-L-Lactat (40mM) als Substrat inkubiert. Eine parallel geführte Versuchsreihe erhielt einen Zusatz von δ-Aminolävulinsäure in einer Endkonzentration von 0,2 mM. Zu festgesetzten Zeiten wurde bei den jeweiligen Kulturen die Inkubation abgebrochen.

Bei Synthese aus endogener δ-Aminolävulinsäure waren nach vier bis fünf Stunden die ersten Porphyrine nachweisbar (Abb.6). Entgegen der Erwartung, daß gemäß des ermittelten Syntheseweges sich in den Kulturen zuerst Uroporphyrin, danach die folgenden Zwischenstufen und zuletzt Protohämin anreichern würden, zeigten sämtliche Versuche, daß zunächst das Häm rasch kumuliert und nach etwa 20 Stunden Konzentrationen erreicht, die sich im Verlauf der weiteren Inkubation nur noch geringfügig erhöhten. In gleicher Weise verhielten sich die Protoporphyrinkonzentrationen, die nach 25 bis 30 Stunden einen asymptotischen Verlauf annahmen.

Interessant ist bei Inkubation im Lactatmedium der Verlauf des Tricarboxyporphyringehaltes. Nachdem die Konzentrationen bei 15 Stunden ein Maximum erreicht hatten, fielen sie wieder ab, um bei tiefer liegenden Werten einen fast konstanten Verlauf während der weiteren Inkubation anzunehmen. Koproporphyrin wurde nur in geringen Mengen gefunden. Es zeigte während der gesamten Kultivierungsperiode einen stetigen, aber unerheblichen Anstieg. Erst gegen Ende der Versuchszeit reicherten sich die Porphyrine mit 8, 7, 6 und 5 Carboxylgruppen an.

In den Kulturen, die exogene δ-Aminolävulinsäure enthielten, waren auch schon nach ein bis zwei Stunden Spuren von Tetrapyrrolen nachweisbar (Abb.7). Die Konzentrationen von Häm und Protoporphyrin zeigten prinzipiell den gleichen Verlauf, wie er bei der Synthese aus Lactat beobachtet worden war. Der Gehalt an Koproporphyrin erreichte nach 30 Stunden fast konstante Werte.

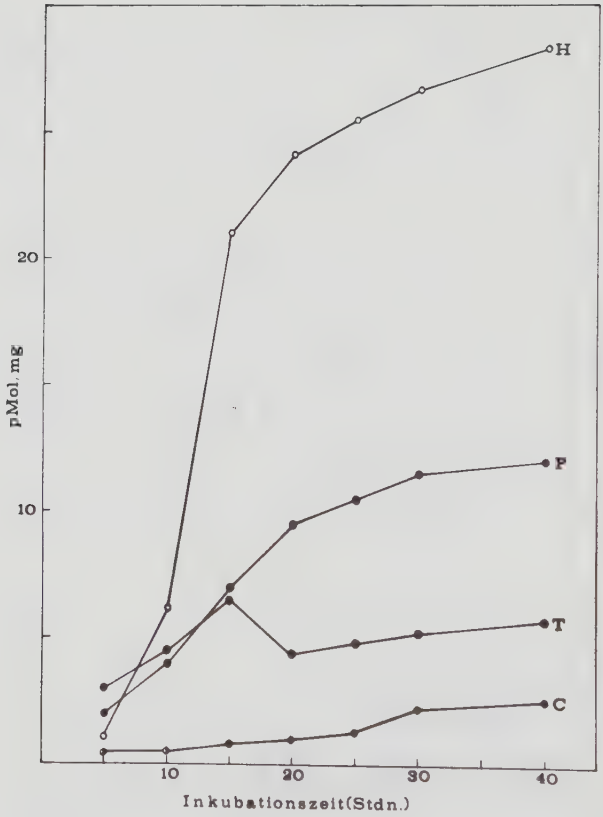

Abb. 6. Porphyrin- und Hämsynthese bei A. metalcaligenes aus Lactat (40 mM) in Relation zur Inkubationszeit. H = Häm, P = Proto-, T = Tricarboxy-, C = Koproporphyrin.

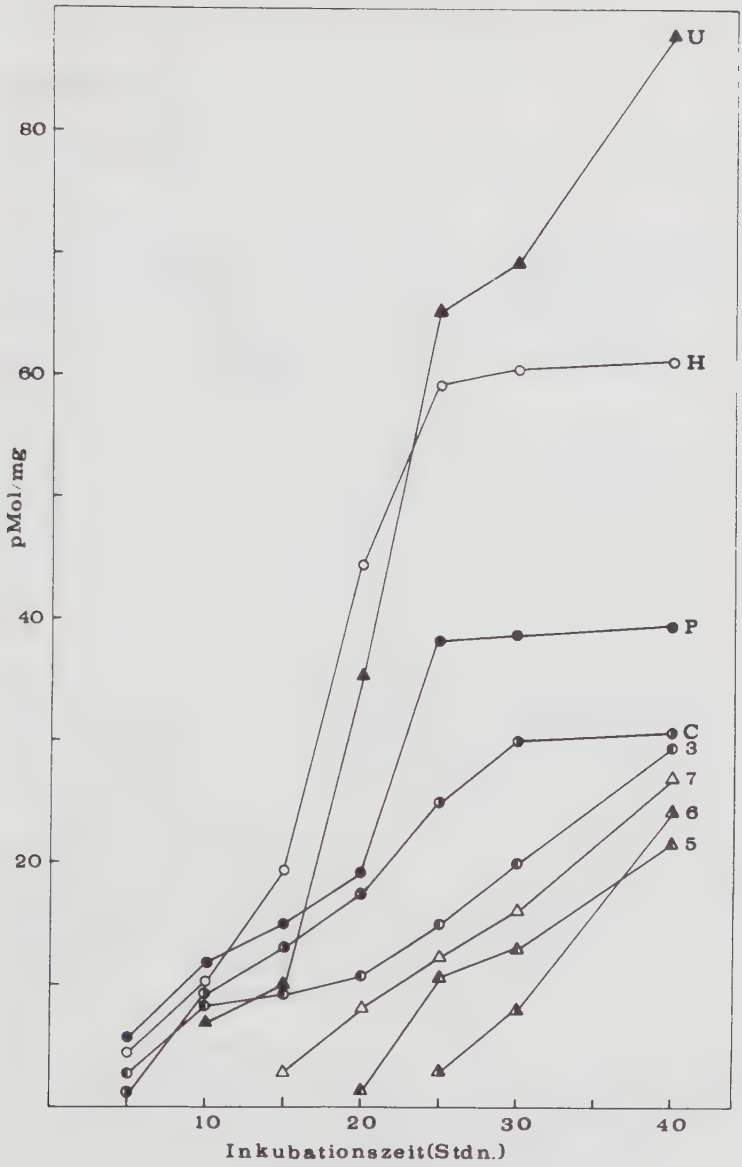

Abb. 7. Porphyrin- und Hämsynthese bei A. metalcaligenes aus δ-Aminolävulinsäure (0,2 mM) in Relation zur Inkubationszeit. H = Häm, U = Uro-, 7 = Heptacarboxy-, 6 = Hexacarboxy-, 5 = Pentacarboxy-, C = Kopro-, 3 = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

Nach 10 Stunden trat Uroporphyrin in meßbaren Mengen auf, um sich in der folgenden Zeit immer stärker anzureichern. Nach etwa 15 Stunden waren Hepta-, nach 20 Stunden Penta- und nach 25 Stunden Hexacarboxyporphyrin nachweisbar. Ihre Konzentrationen stiegen während der weiteren Inkubation wie die des Uroporphyrins stetig an.

Unsere Befunde, nach denen sich im scheinbaren Widerspruch zum Syntheseweg zuerst Hämin und Protoporphyrin anreichern, werden durch klinische und tierexperimentelle Beobachtungen unterstützt. So wurde mehrfach über hohe Porphyrinkonzentrationen in der Leber von Versuchstieren mit experimenteller Porphyrie berichtet[147,171,172]. Auch bei der Applikation von Griseofulvin wurde in der Rattenleber[125,126] und in der Leber eines Patienten, der hiermit länger behandelt wurde[193], hohe Protoporphyrinkonzentrationen gefunden. Da den arzneimittelinduzierten Porphyrien eine Aktivierung der δ-Aminolävulinsäure-Synthase zugrunde liegt[31], sind diese Beobachtungen durchaus mit den Ergebnissen zu vergleichen, die aus unseren Systemen mit exogener δ-Aminolävulinsäure erhalten wurden.

Wie die forcierte Synthese vor allem der unteren Porphyrinstufen nach Zusatz von δ-Aminolävulinsäure vermuten läßt, scheint der δ-Aminolävulinsäure-Synthase die Funktion eines Schlüsselenzyms zuzukommen. Im Verlauf der Synthese aus Lactat tritt nach Erreichen einer bestimmten Hämkonzentration eine Hemmung der weiteren Synthese ein, die nach Zusatz von δ-Aminolävulinsäure umgangen wird. BURNHAM und LASCELLES[14] wiesen an Präparationen der δ-Aminolävulinsäure-Synthase aus Rhodopseudomonas spheroides die hemmende Wirkung des Häms und des Protoporphyrins nach, wobei letztere nicht so stark ausgeprägt war.

Da aber auch bei Züchtung mit zugesetzter δ-Aminolävulinsäure die Konzentrationen von Häm, Proto- und Koproporphyrin asymptotisch verlaufen, während der Gehalt der Porphyrine mit acht bis fünf Carboxylgruppen steil ansteigt, scheint dieser eine Regelmechanismus nicht für alle Phänomene verantwortlich zu sein. Es liegt nahe, zumindest auf der Stufe der Proto- und Koproporphyrinogenbildung eine feedback-Hemmung der dem jeweiligen Reaktionsprodukt vorgeordneten Enzyme anzunehmen.

IV. Einfluß verschiedener Substrate auf die Synthese cyclischer Tetrapyrrole bei A.metalcaligenes

a) Wachstum und Tetrapyrrolsynthese in Medien mit einem Substrat

Für diese Versuche wurde der Mediumbasis je eine der in Tab.4 aufgeführten Substanzen in einer Endkonzentration von 40 mM zugesetzt und die Kulturen für 32 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden das Wachstum und die Gesamtsynthese bestimmt. Repräsentative Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tab.4 zusammengestellt.

Von den vier eingesetzten Aminosäuren konnte Glycin nicht utilisiert werden. Glutaminat und Alanin ermöglichten ein mäßiges Wachstum mit relativ geringen Syntheseraten. Dagegen waren bei Inkubation mit Glutamat Wachstum und Syntheseleistung optimal.

Mit Pyruvat, Acetat und Äthanol als jeweils einziger Energiequelle wuchs A.metalcaligenes nur mäßig, mit Glycerin gar nicht, dagegen mit L-Lactat und DL-Lactat sehr gut. Mit den fünf utilisierbaren Substraten wurden etwa gleichgroße Ausbeuten an Tetrapyrrolen erzielt.

Von den Verbindungen des Citratcyclus wurden Citrat, Isocitrat und α-Ketoglutarat nicht verwertet. Mit Fumarat, Succinat, Malat und Oxalacetat lag das Wachstum in mittleren Bereichen mit Häm- und Porphyrinkonzentrationen, die denen der Kulturen mit Glutamat entsprachen.

b) Wachstum und Tetrapyrrolsynthese in Medien mit zwei Substraten

Da A.metalcaligenes in dem Lactat-Medium maximales Wachstum zeigte, lag es nahe, dieses Substrat mit einem zweiten zu kombinieren, das allein eine gleichgroße oder größere Tetrapyrrolsynthese ausgelöst hatte. Neben 20 mM L-Lactat wurden

Tab. 4. Einfluß verschiedener Substrate auf Wachstum und Tetrapyrrolsynthese von A. metalcaligenes. Alle Substrate wurden in einer Endkonzentration von 40 mM zugesetzt. S = Spuren, K = Kopro-, T = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

Substrat	Wachstum	Häm	Gesamt-porphyrine	Einzelfraktionen K	T	P
	(mg/ml)	----------(pMol/mg)----------				
Na-L-Lactat	0,61	19,4	34,6	7,7	11,1	15,8
Na-DL-Lactat	0,63	12,4	27,0	6,7	7,8	12,6
Na-Pyruvat	0,48	18,4	23,9	7,4	S	16,5
Na-Acetat	0,32	18,3	22,8	7,6	1,9	13,3
Äthanol	0,26	13,9	8,9	4,1	S	4,8
Glycerin	kein Wachstum					
Na-L-Glutamat	0,64	68,0	18,2	6,2	S	12,0
Na-L-Glutaminat	0,17	7,3	6,9	5,2	S	1,7
L-Alanin	0,27	9,8	6,2	3,5	S	2,7
L-Glycin	kein Wachstum					
Na-Fumarat	0,27	20,4	30,0	9,3	8,2	14,5
Na-Succinat	0,17	26,0	24,5	0,8	7,7	16,0
Na-DL-Malat	0,34	54,9	11,1	1,2	5,5	4,4
Na-Oxalacetat	0,26	68,3	8,6	0,7	4,3	3,6
Na-Citrat	kein Wachstum					
Na-DL-Isocitrat	kein Wachstum					
Na-α-Keto-glutarat	kein Wachstum					

je 20 mM der in Tab.5 aufgeführten Salze der Mediumbasis zugeführt.

Mit allen Substratkombinationen wurden bei unterschiedlichem Wachstum hohe Syntheseraten erreicht. Allerdings war das Wachstum nur mit der Kombination von Lactat und Fumarat optimal. Um eine möglichst große Zellausbeute zu erzielen, die es gestattet, auch aus kleinen Kulturansätzen sichere Ergebnisse zu erhalten, wurden für weitere Untersuchungen in definierten Medien als Substratzusätze entweder L-Lactat oder die Kombination von L-Lactat und Fumarat gewählt. Die sich anbietende Kombination von Glutamat und L-Lactat konnte nicht verwandt werden, da Glutamat in der vorliegenden Mediumbasis sich nur schwer in Lösung bringen ließ, bei Temperaturen unter 30° C auskristallisierte und daher Mediumwechsel und Zentrifugieren erschwert hätte.

c) Vergleich der Tetrapyrrolsynthese in definierten und komplexen Medien

Wie an einem typischen Beispiel dieser Versuchsserie in Tab.6 gezeigt wird, entstehen im Lactatmedium etwa 50% mehr Porphyrine und achtfach höhere Häminkonzentrationen als im komplexen Medium (Tryptone Soya Broth). Die gesamte Tetrapyrrolsyntheserate war etwa dreimal größer. Interessant ist, daß bei den im komplexen Medium gezüchteten Zellen Koproporphyrin die größte Porphyrinfraktion bildete.

d) Stimulierung der Tetrapyrrolsynthese durch Lactat in resuspendierten Zellen

Für diese Versuche wurden Zellen von A.metalcaligenes in Tryptone Soya Broth-Medium angezüchtet, sedimentiert (vgl.S.10) und in Lactatmedium (40 mM) resuspendiert. Für parallele Vergleichskulturen wurden angezüchtete Zellen im komplexen Medium zur gleichen Dichte suspendiert und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Bei den im komplexen Medium resuspendierten Zellen stiegen die

Häm- und Porphyrinkonzentrationen im Vergleich zum Ausgangsmaterial nur geringfügig an (Abb.8). Das Verteilungsmuster mit Koproporphyrin als dominierender Fraktion änderte sich nicht. Dagegen wird augenscheinlich durch das Umsetzen der Zellen in das Lactatmedium die Hämsynthese erheblich stimuliert und auch das vorliegende Koproporphyrinogen zu Protoporphyrin metabolisiert.

Um festzustellen, ob im Sinne einer Induktion eine Neusynthese der spezifischen Enzyme eintrat, wurde versucht, die Aktivität der δ-Aminolävulinsäure-Synthase in zellfreien Extrakten zu bestimmen. Bisher gelang es weder bei A.metalcaligenes noch bei den beiden anderen heterotrophen Spezies, die δ-Aminolävulinsäure-Synthase nachzuweisen. Da auch die Konzentrationen von Porphobilinogen stets unterhalb der Nachweisgrenze der zur Verfügung stehenden Methode lag, konnte nur der Vergleich der δ-Aminolävulinsäurekonzentrationen der in den unterschiedlichen Medien kultivierten Zellen herangezogen werden. Die im Lactat-Medium suspendierten Zellen enthielten etwa um 30% höher liegende δ-Aminolävulinsäurekonzentrationen als die Zellen des komplexen Mediums (Tab.7).

In zellfreien Extrakten der im Lactat-Medium resuspendierten Zellen wurde eine zehnmal größere Aktivität der Lactat-Dehydrogenase nachgewiesen als in Zellextrakten des Ausgangsmaterials (Tab.7).

Einer Serie von Vergleichskulturen wurde in das Lactat-Medium Puromycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml gegeben. In Vorversuchen war diese Konzentration, bei der das Wachstum sistierte, ermittelt worden (Tab.8). In diesen unter gleichen Bedingungen inkubierten Systemen lagen die Konzentrationen von Protohämin, Porphyrinen und δ-Aminolävulinsäure sowie die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase nur geringfügig über den jeweiligen Werten der Stammkulturen (Tab.7, Abb.8). Wie Versuche mit steigenden Puromycindosen ergaben, ließ sich die Stimulierung der Mehrsynthese kontinuierlich unterdrücken (Tab.9).

Tab. 5. Einfluß von Substratkombinationen auf Wachstum und Tetrapyrrolsynthese von A. metalcaligenes. Die beiden Komponenten wurden in einer Endkonzentration von je 20 mM zugesetzt. K = Kopro-, T = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

Substrate	Wachstum (mg/ml)	Häm	Gesamt - porphyrine	Einzelfraktionen K	T	P
		----------(pMol/mg)----------				
L-Lactat/Pyruvat	0,55	21,1	45,8	6,3	9,4	30,1
L-Lactat/Acetat	0,43	26,6	46,0	9,2	3,3	33,5
L-Lactat/Glutaminat	0,33	25,4	38,6	11,2	7,3	20,1
L-Lactat/Glutamat	0,55	38,7	50,5	19,0	3,8	27,7
L-Lactat/Malat	0,39	26,3	44,8	15,1	5,8	23,9
L-Lactat/Fumarat	0,62	40,3	25,6	3,4	5,2	17,0
L-Lactat/Succinat	0,38	29,0	48,2	14,4	4,8	29,0

Tab. 6. Porphyrin- und Hämsynthese aus L-Lactat und Tryptone Soya Broth (TSB) bei A. metalcaligenes. K = Kopro-, T = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

Medium	Wachstum (mg/ml)	Gesamt-tetrapyrrole	Häm	Gesamt - porphyrine	Anteil der Einzelfraktionen (%) K	T	P
		-------(pMol/mg)--------					
TSB	0,67	14,2	3,7	10,5	59,1	10,4	30,5
L-Lactat	0,64	47,4	29,1	18,3	12,3	27,0	60,7

Tab. 7. δ-Aminolävulinsäure (ALS) und Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität in resuspendierten Zellen von A. metalcaligenes nach Inkubation in Tryptone Soya Broth (TSB)- und Lactat-Medien, sowie in Lactat-Medien mit Zusatz von Puromycin (30 µg/ml Kulturflüssigkeit). Vor der Resusspension betrug der Gehalt an δ-Aminolävulinsäure 0,07 µg/mg Bakterientrockengewicht und die Aktivität der LDH 134 mU/mg Protein. Die Suspensionsdichte der Kulturen betrug 1,23 mg/ml.

Medium	ALS (µg/mg Trockengewicht)	LDH-Aktivität (mU/mg Protein)
TSB	0,073	178
Lactat	0,104	1320
Lactat/Puromycin	0,072	335

e) Stimulierung der Tetrapyrrolsynthese durch Lactat bei E.coli

Die unter d) dargestellten Ergebnisse erschienen wichtig genug, um gleiche Untersuchungen auch an einem anderen Organismus zu wiederholen. In gleicher Weise wurden daher auch von E.coli resuspendierte Kulturen angelegt und inkubiert. Für Puromycin ergab sich eine wirksame Hemmdosis von 40 µg/ml (Tab.8).

Wie Abb.9 darstellt, traten bei den im Tryptone Soya Broth-Medium resuspendierten Zellen nur geringfügig höher liegende Porphyrin- und Hämkonzentrationen auf als bei den Stammzellen. Im Lactat-Medium ist dagegen wieder eine forcierte Tetrapyyrolsynthese nachweisbar. Im Gegensatz zu A.metalcaligenes bleibt auch unter diesen Bedingungen Koproporphyrin die dominierende Porphyrinfraktion. Durch Zusatz von Puromycin konnte die Stimulierung der Synthese vollständig unterdrückt werden.

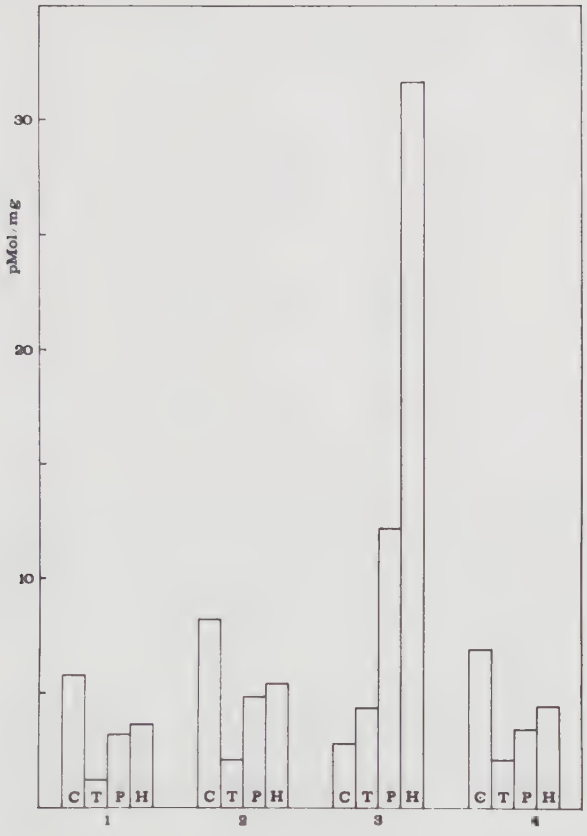

Abb. 8. Tetrapyrrolsynthese der in Tryptone Soya Broth (TSB)-Medium angezüchteten Zellen von A. metalcaligenes nach Resuspension im Lactat-Medium (Suspensionsdichte 1,34 mg/ml). 1 = Stammzellen, 2 = Resuspension im TSB-Medium, 3 = Resuspension im Lactat-Medium, 4 = Resuspension im Lactat-Medium mit Puromycin (30 µg/ml). H = Häm, P = Proto-, T = Tricarboxy-, C = Koproporphyrin.

Tab. 8. Einfluß von steigenden Puromycinkonzentrationen auf das Wachstum von A.metalcaligenes (1) und E.coli (2) in Lactat-Medien.

Puromycin - konzentration (g/ml)	Wachstum nach 32 Stunden (mg/ml)	
	1	2
-	0,64	0,51
10	0,58	0,50
20	0,20	0,31
30	0,02	0,22
40	0,02	0,02

Tab. 9. Einfluß von steigenden Puromycinkonzentrationen auf die Porphyrin- und Hämsynthese resuspendierter Zellen von A. metalcaligenes (1) und E. coli (2) in Lactat-Medien. Die Suspensionsdichte der Kulturen betrug 1,23 mg/ml. K = Kopro-, T = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

Spezies	Puromycin - konzentration (g/ml)	Häm	Gesamt - porphyrine	Anteil der Einzelfraktionen (%)		
				K	T	P
		---(pMol/mg)---				
1	-	31,6	29,9	34,2	14,5	51,3
	10	27,2	28,5	35,2	14,0	50,8
	20	12,2	25,4	33,5	14,2	55,5
	30	5,5	19,4	62,5	14,3	23,3
	40	4,6	19,3	68,0	11,7	20,3
2	-	27,5	21,3	49,0	16,6	34,4
	10	26,8	21,2	51,2	15,8	33,0
	20	26,5	20,3	50,5	16,4	33,5
	30	14,1	14,4	64,1	17,7	18,2
	40	5,9	9,2	71,8	16,8	11,4

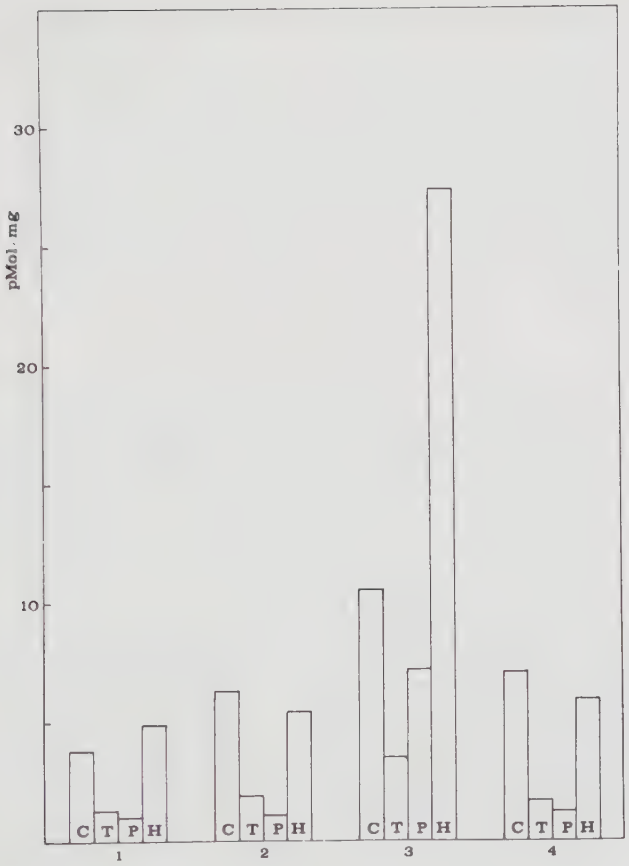

Abb. 9. Tetrapyrrolsynthese der in Tryptone Soya Broth (TSB)-Medium angezüchteten Zellen von E. coli nach Resuspension im Lactat-Medium (Suspensionsdichte 1,29 mg/ml). 1 = Stammzellen, 2 = Resuspension in TSB-Medium, 3 = Resuspension in Lactat-Medium, 4 = Resuspension in Lactat-Medium mit Puromycin(40 µg/ml). H = Häm, P = Proto-, T = Tricarboxy-, C = Koproporphyrin.

f) Diskussion

Untersuchungen über die Tetrapyrrolsynthese von A.metalcaligenes in verschiedenen definierten Medien wurden auch von MANNHEIM und BÜRGER[119] durchgeführt, wobei allerdings nur die Ausscheidung von Häm und Protoporphyrin anhand des Wachstums von Hämophilus influenzae (vgl. GRANICK u.GILDER[67]) indirekt bestimmt wurde. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Methodik lassen sich weitgehende Übereinstimmungen feststellen. Ähnliche Beziehungen der Syntheserate zum Substratangebot beobachtete auch LASCELLES bei Rhodopseudomonas spheroides[103] und Tetrahymena vorax[105].

Wachstum und Tetrapyrrolsynthese bei Inkubation mit C_2- und C_3-Verbindungen deuten darauf hin, daß A.metalcaligenes über die notwendigen anaplerotischen Sequenzen verfügt[96,97]. Die höheren Syntheseraten aus Fumarat, Malat, Succinat, Oxalacetat und Glutamat waren fast zu erwarten, da ja hiermit direkte Vorstufen angeboten werden.

Da der Keim mit α-Ketoglutarat nicht, dagegen mit Glutamat und Glutaminat gut wächst, scheint ein Defekt der α-Ketoglutarat-Dehydrogenase vorzuliegen, wie er auch für Micrococcus glutamicus[150] angenommen wird. Der Abbau des Glutamat könnte demnach über 4-Aminobutyrat und Succinylsemialdehyd[89] zum Succinat erfolgen[22,197]. Glutaminat würde durch die Glutaminase in Glutamat überführt werden. Das Ausbleiben des Wachstums mit Citrat und Isocitrat kann vorläufig nicht erklärt werden; möglicherweise könnte eine Fällung der in Spuren vorliegenden Calciumionen als Ursache anzusehen sein.

Die ermittelte Aktivität der Lactat-Dehydrogenase in A.metalcaligenes ist kleiner als von Hefezellen[1] oder Staphylococcus aureus[19,186]. Sie lag etwa in der Größenordnung von in Lactobazillaceen[24,180] und E.coli[90] bestimmten Werten.

Der Bakterienzelle liegt im komplexen Medium eine Vielzahl von Verbindungen vor, die sie für eigene Syntheseprozesse oder zur Energiegewinnung heranziehen kann. Bei Wachstum in definierten

Medien ist sie gezwungen, ihre Energie für katabole wie anabole Stoffwechselleistungen fast ausschließlich mit Hilfe der Atmungskettenphosphorylierung zu gewinnen. Hierzu wird die Synthese von Hämderivaten unter Induktion der vorgeordneten Enzyme forciert. Da sowohl die Lactat-Dehydrogenase wie die an der Tetrapyrrolsynthese beteiligten Enzyme als Faktoren des elementaren Zellstoffwechsels zu den "konstitutiven Enzymen" zu rechnen sind, kann eine durch Induktion verursachte zusätzliche Neubildung niemals so hohe Konzentrationen erreichen, wie sie mit "induzierbaren Enzymen" wie der β-Galaktosidase erzielt wurden[23,139].

Bei den aus klinischen Beobachtungen[12] und Zellkulturexperimenten[31] bekannten arzneimittelinduzierten Porphyrien werden die Derivate des Protohämins als prosthetische Gruppen der arzneimittelabbauenden Enzyme vermehrt benötigt. Es ist interessant, daß auch in der Bakterienzelle durch Meprobamat eine gesteigerte Porphyrinsynthese aus endogen gebildeter δ-Aminolävulinsäure provoziert wurde[30]. Wie in den vorliegenden Experimenten konnte mit Puromycin, Chloramphenicol, Actinomycin D,und anderen Inhibitoren der Proteinsynthese in tierischen wie bakteriellen Zellen die Induktion vollständig unterdrückt werden[20,31,66,80,149]. Somit erscheint es gesichert, daß diese Induktion nicht auf einer Änderung der Konformation als allosterischer Übergang am Enzymprotein beruht[133,134,181], sondern als Neusynthese der Enzyme zu verstehen ist. Entsprechend der Vorstellung von JACOB und MONOD[86,132] würde diesem Vorgang eine Derepression der determinierten Operatorgene zugrunde liegen. Ob aber auch nur eine Translokation von schon gebildeter messenger-RNA, der nach STENT[183] eine ebenso große Bedeutung für Induktionsphänomene wie der Transcription zukommt, stimuliert wird, kann zumindest unter unseren Versuchsbedingungen nicht entschieden werden.

In Analogie zu anderen Synthesewegen scheint bei allen Zelltypen der Induktionsvorgang in gleicher Weise unabhängig von

den auslösenden Faktoren zu verlaufen[198]. Ob die Induktion lediglich die δ-Aminolävulinsäure-Synthase betrifft, oder alle Enzyme der Synthesekette erfaßt, kann noch nicht endgültig beurteilt werden. GRANNICK und URATA[71] berichteten, daß in Leberzellfraktionen von Tieren, denen DDC appliziert worden war, aus δ-Aminolävulinsäure 25% mehr Porphobilinogen synthetisiert und 57% mehr Porphobilinogen zu Prophyrinen konvertiert wurden als in den Fraktionen der Kontrolltiere. Auch Versuche mit exogener δ-Aminolävulinsäure in menschlichen Reticulocyten lassen vermuten, daß eventuell eine multifaktorielle Beeinflussung vorliegt[77].

V. Einfluß der Belüftung auf die Porphyrin- und Hämsynthese bei Achromobacter metalcaligenes

Da über den Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes auf die Biosynthese von cyclischen Tetrapyrrolen bei phototrophen[109,122] und heterotrophen Bakterien[87,88,158] eingehende Untersuchungen vorliegen, wurde lediglich eine kleine Versuchsserie angesetzt, um festzustellen, ob A.metalcaligenes hinsichtlich seiner Tetrapyrrolsynthese bei verschiedenen Belüftungsverhältnissen von den bisher ermittelten Ergebnissen abweicht.

Es kam ein definiertes Medium mit Natrium-L-Lactat und Natriumfumarat zur Anwendung. Neben der bisher verwendeten Versuchsanordnung, wobei 150 ml Kulturmedium in 500 ml Erlenmeyerkolben inkubiert worden waren, wurde die gleiche Menge an Kulturflüssigkeit auch in 300 ml- und 1000 ml-Erlenmeyerkolben gegeben. Im Gegensatz zu früheren Experimenten mit A.metalcaligenes[95] setzten wir dem Medium keine δ-Aminolävulinsäure zu.

In allen Ansätzen wiesen die in 1000 ml-Kolben inkubierten Kulturen die geringste Syntheserate auf (Abb.10). Mit abnehmender Belüftungsintensität erhöhten sich die Konzentrationen von Häm und sämtlichen Porphyrinkonzentrationen. In Übereinstimmung mit Experimenten an hämophilus parainfluenzae[196], E.coli[199] und Pseudomonas fluorescens[144] hemmen auch bei A.metalcaligenes höhere Belüftungsintensitäten die Tetrapyrrolsynthese. In gleicher Weise scheint auch der tierische Organismus auf Änderungen des Sauerstoffgehaltes zu reagieren[54].

Wie Untersuchungen an Enzympräparationen von Rhodopseudomonas spheroides ergaben[109], werden die Aktivitäten von δ-Aminolävulinsäure-Synthase und δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase mit Zunahme der Belüftung gehemmt. Einen Ansatz zur genaueren Kenntnis dieses Hemmeffektes geben die Arbeiten von MARRIOT[122],

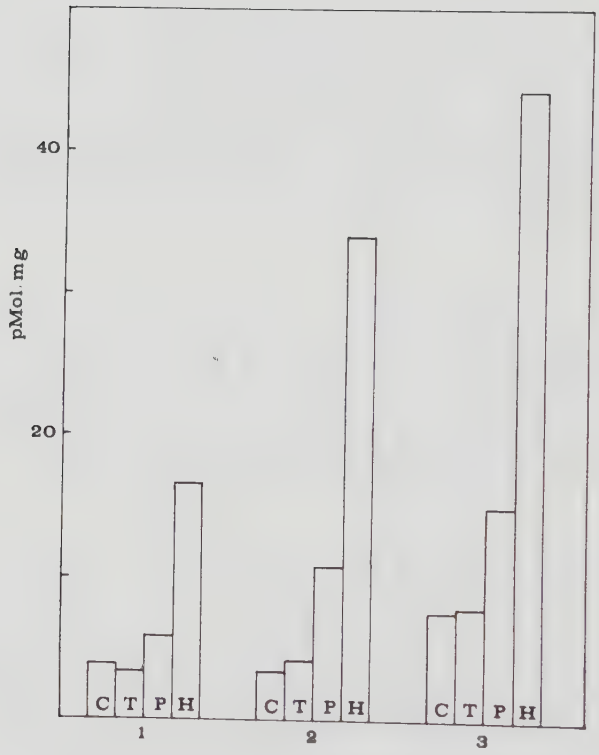

Abb. 10. Einfluß der Belüftung auf die Tetrapyrrolsynthese von A. metalcaligenes aus L-Lactat und Fumarat (je 20 mM). Inkubation von 150 ml Kulturvolumen in Erlenmeyerkolben von 1000 ml (1), 500 ml (2) und 300 ml (3) Fassungsvermögen. H = Häm, P = Proto, C = Kopro-, T = Tricarboxyporphyrin.

die Aktivatoren und Inhibitoren von niederem Molekulargewicht nachweisen konnte, welche in Abhangigkeit vom Sauerstoffgehalt in Kulturen von Rhodopseudomonas auftraten.

JACOBS et al.[88] konnten bei einem anaerob gezüchteten Stamm von Staphylococcus epidermides die Biosynthese bis zur Stufe des Koproporphyrinogens verfolgen. Die folgenden Syntheseschritte benötigten aber Sauerstoff. Eine vollständig ohne Sauerstoff verlaufende Bildung von Protohämin wurde bei Desulphovibrio desulfuricans[159] und einem Stamm von E.coli[74] beobachtet. Auch in zellfreien Extrakten von E.coli und Pseudomonas denitrificans[87] verlief die Konversion von Koproporphyrinogen zu Protoporphyrin anaerob. In den eukaryontischen Zellen scheint aber dieser letzte Schritt stets Sauerstoff zu benötigen[166].

VI. Einfluß des Eisens auf die Synthese von Porphyrinen und Protohämin bei A.metalcaligenes

Daß unterschiedliche Eisenkonzentrationen einen erheblichen Einfluß auf die Tetrapyrrolsynthese heterotropher Bakterien haben, wurde zuerst von PAPPENHEIMER[151] an Corynebacterium diphtheriae beobachtet. Bei steigenden Eisenkonzentrationen des Kulturmediums trat ein kontinuierlicher Rückgang der Porphyrin- und Toxinkonzentrationen auf. Dagegen reicherten sich die Cytochrome parallel zum steigenden Eisengehalt an[152]. Ähnliche Ergebnisse ermittelten TODD[188] bei Mycobacterium karbinskii, RAWLINSON und HALE[164] sowie GRAY und HOLD[73] bei Corynebacterium diphtheriae und LASCELLES[102] bei Rhodopseudomonas spheroides. Auch für höhere Pflanzen wurden analoge Effekte beschrieben[81].

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Mediumbasis stets Natrium-L-Lactat und Natrium-Fumarat (je 20 mM) zugesetzt.

a) Untersuchungen mit A.metalcaligenes

Den Kulturen einer Versuchsserie setzten wir steigende Konzentrationen von Eisen-(III)-citrat zu. Schon bei 10^{-6} Mol Eisencitrat konnten ein deutlich erhöhter Hämgehalt und geringere Porphyrinkonzentrationen ermittelt werden (Tab.10). Während die Proto- und Tricarboxyporphyrinkonzentrationen unter steigenden Eisengaben kontinuierlich abfielen, reicherte sich Koproporphyrin vermehrt an. Mit der Konzentration von 10^{-5} Mol Eisencitrat wurden die höchsten Hämsyntheseraten und die kleinsten Porphyrinausbeuten erhalten. Bei höheren Eisenkonzentrationen stellte sich eine zunehmende Hemmung der gesamten Synthese ein. Das Wachstum der Kulturen wurde von den unterschiedlichen Eisengehalten nicht beeinflußt. Den folgenden Versuchsserien wurde stets Eisen-(III)-citrat in einer Konzentration von 10^{-5} Mol zugesetzt.

Tab. 10. Einfluß steigender Konzentrationen von Eisen-(III)-citrat auf die Porphyrin- und Hämsynthese von A. metalcaligenes. K = Kopro-, T = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

Kultur	Eisen	Wachstum	Häm	Gesamt-porphyrine	Anteil der Einzelfraktionen (%) K	T	P
	(Mol/l)	(mg/ml)	---(pMol/mg)---				
Kontrolle	-	0,69	33,6	17,2	18,2	20,7	61,1
1	10^{-7}	0,68	46,2	15,4	23,5	21,2	55,3
2	10^{-6}	0,64	52,7	13,6	37,3	20,1	42,6
3	$5x10^{-6}$	0,70	67,3	12,8	47,0	20,6	32,4
4	10^{-5}	0,65	79,7	12,2	56,2	19,7	24,1
5	$5x10^{-5}$	0,69	62,1	10,9	66,7	9,2	28,1
6	10^{-4}	0,61	38,8	6,2	57,1	2,1	40,8

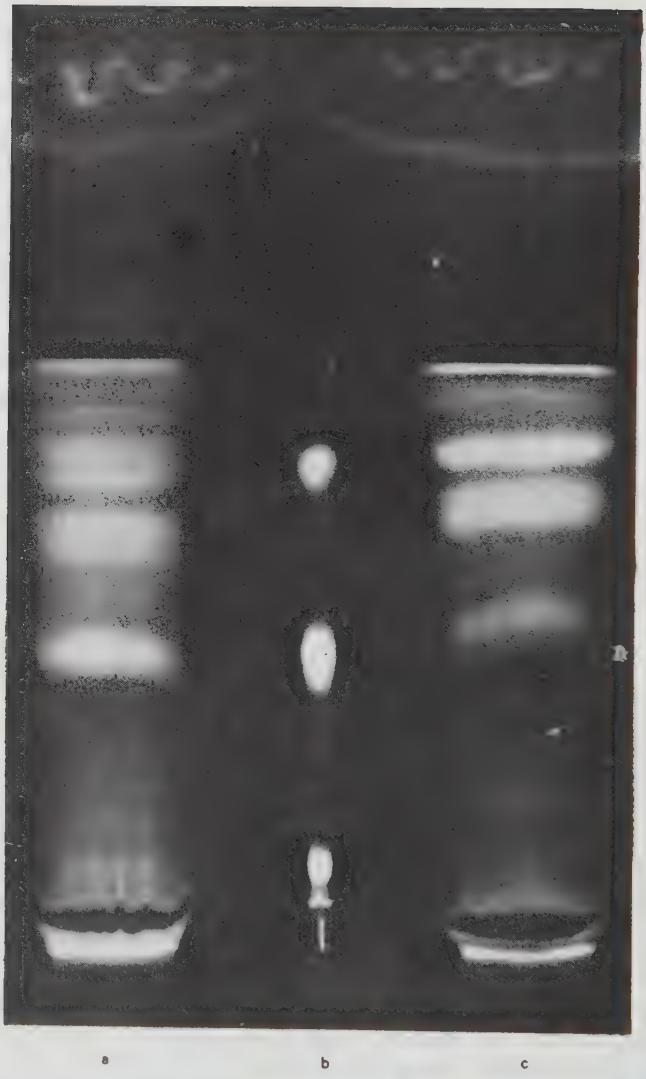

Abb. 11. Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm mit Methylestern von Häm und Porphyrinen aus Kulturen von A. metalcaligenes nach Inkubation in Lactat/Fumarat-Medien (je 20 mM). Analyse der Gesamtkulturen. a = Zusatz von Eisen-(III)-citrat (10^{-5} Mol), b = Testsubstanzen, c = Vergleichskultur. H = Häm, K = Kopro-, T = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

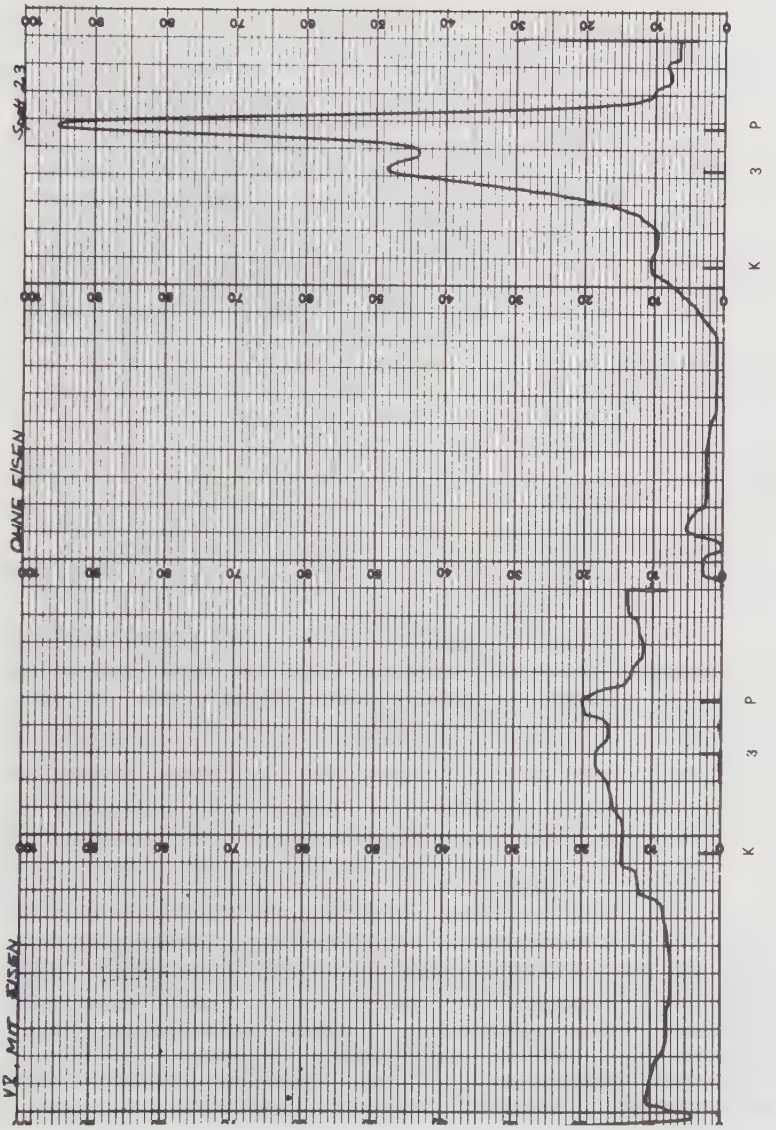

Abb. 12. Fluorometrische Analyse der Porphyrinmethylester des Chromatogramms von Abb. 11 (Bezeichnungen und Meßapparatur vgl. S. 19).

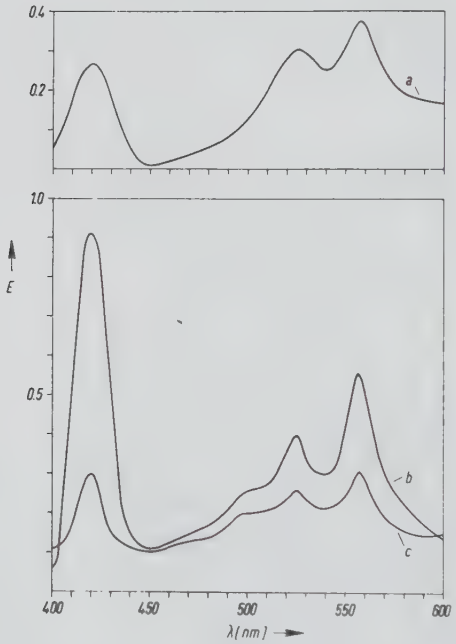

Abb. 13. Differenzspektrum (reduziert minus oxydiert) des Cytochrom b als Pyridinhämochromogen von intakten Zellen (a), sowie der isolierten prosthetischen Gruppe aus Zellen einer mit Eisen-(III)-citrat inkubierten Kultur (b) und aus Zellen einer ohne Eisenzusatz inkubierten Kultur (c) von A. metalcaligenes. Die Messung von (a) erfolgte mit dem Hitachi-Spektralphotometer EPS-3T mit Einrichtung für diffuse Reflexion. (b) und (c) wurden mit dem Beckman-Spektralphotometer DB-G gemessen.

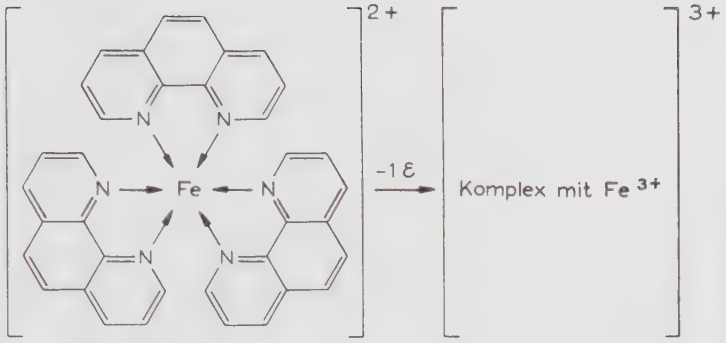

Abb. 14. Eisen(II)- und Eisen(III)-Komplex des o-Phenanthrolin (n. AUTERHOFF[2]).

Eine Gegenüberstellung der Syntheseraten in Kulturen mit und ohne Eisenzusatz ergab (Tab.11), daß mit Eisen etwa 56% mehr Protohämin und 30% weniger Porphyrine gebildet wurden. Während Protoporphyrin mit ca. 64% in den Vergleichskulturen die stärkste Fraktion darstellte, verminderte sich sein Anteil unter Eisen auf 39%. Dagegen verdreifachte sich der prozentuale Gehalt an Koproporphyrin nach Eisenzusatz gegenüber den Vergleichskulturen. Interessant ist, daß der Anteil an Tricarboxyporphyrin unabhängig vom Eisengehalt konstant bei etwa 25% lag.

Parallel geführten Kulturen wurde neben Eisencitrat o-Phenanthrolin (10^{-5} Mol) zugesetzt. Damit konnte der Einfluß des Eisens weitgehend aufgehoben werden. Da bei Zusatz von 10^{-4} Mol eine völlige Hemmung und bei 10^{-5} Mol ein deutlicher Rückgang des Wachstums eintraten (Tab.12), wurde stets die Konzentration von 10^{-5} Mol gewählt, obwohl damit im Vergleich zu den Kontrollkulturen noch höhere Häm- und Koproporphyrinkonzentrationen

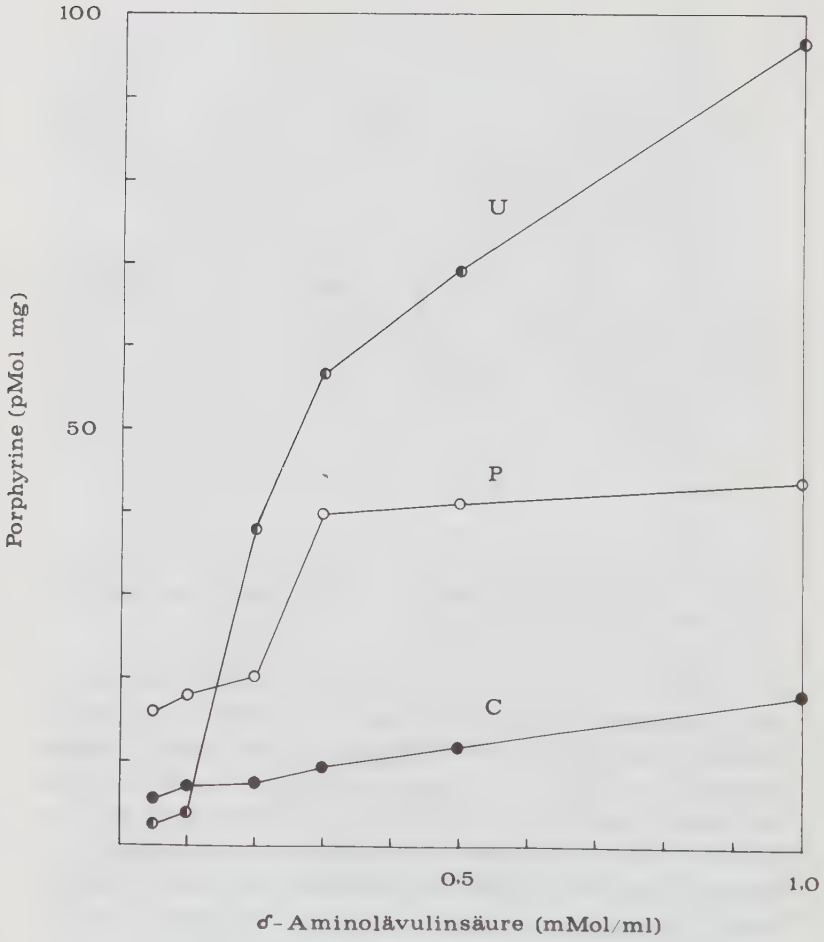

Abb. 15. Synthese von Uro- (U), Kopro- (K) und Protoporphyrin (P) aus steigenden Konzentrationen exogener δ-Aminolävulinsäure in wachsenden Kulturen von A. metalcaligenes (Inkubation in Kulturröhrchen vgl. S. 10).

Tab. 11. Einfluß von Eisen-(III)-citrat (10^{-5} M), δ-Aminolävulinsäure (ALS) (10^{-4}) und o-Phenanthrolin (o-Phe.) (10^{-5} M) auf die Porphyrin- und Hämsynthese von A.metalcaligenes. S = Spuren.

Zusätze			Wachstum	Häm	Gesamt-porphyrine	Anteil der Einzelfraktionen (%)						
ALS	Eisen	o-Phe.	(mg/ml)	--(pMol/mg)--		Uro	7 COOH	6 COOH	5 COOH	Kopro	3 COOH	Proto
-	-	-	0,69	36,1	19,8	-	-	-	-	11,2	24,3	64,5
-	+	-	0,66	85,0	12,0	-	-	-	-	36,0	24,6	39,4
-	+	+	0,57	59,7	13,1	-	-	-	-	23,1	25,4	51,5
+	-	-	0,70	70,2	283,3	30,1	11,5	10,7	11,5	10,5	9,9	15,8
+	+	-	0,67	124,4	96,4	25,1	S	S	S	51,1	16,7	7,1
+	+	+	0,60	80,1	160,2	38,1	4,8	S	3,4	22,8	14,1	16,8

Tab. 12. Einfluß steigender o-Phenanthrolinkonzentrationen (o-Phe.) auf die Porphyrin- und Hämsynthese von A. metalcaligenes.

Zusätze (M)		Wachstum	Häm	Gesamt - porphyrine	Anteil der Einzelfraktionen (%)		
Eisen	o-Phe.	(mg/ml)	--(pMol/mg)--		Kopro	3 COOH	Proto
-	-	0,68	53,7	19,6	13,1	21,6	65,3
10^{-5}	-	0,66	90,7	11,6	37,0	25,2	37,8
10^{-5}	10^{-7}	0,66	90,0	11,7	36,0	25,5	38,5
10^{-5}	10^{-6}	0,63	80,2	12,2	24,6	25,1	50,3
10^{-5}	10^{-5}	0,57	68,7	13,9	20,4	27,5	52,1
10^{-5}	10^{-4}	kein Wachstum					

erhalten wurden. Entsprechend der Vorstellung, daß ein Mol Eisen mit drei Molen o-Phenanthrolin einen stabilen Komplex bildet[129], wäre mit Konzentrationen von 3×10^{-5}M eine vollständige Kompensation des Eiseneffektes zu erwarten gewesen.

Die Analyse der δ-Aminolävulinsäure aus den Zellen ergab, daß unter dem Einfluß des Eisens die Syntheserate von δ-Aminolävulinsäure um 30% vermindert wird.

LASCELLES[103] hatte bei Rhodopseudomonas spheroides die Hemmung der Tetrapyrrolsynthese unter Eisen durch Zusatz von exogener δ-Aminolävulinsäure ausschalten können und dabei beobachtet, daß das Verteilungsmuster der Porphyrinfraktionen sich nicht änderte. In einem Vorversuch mit Röhrchenkulturen (vgl.S.10) wurden die Syntheseraten von Uro-, Kopro- und Protoporphyrin aus ansteigenden δ-Aminolävulinsäurekonzentrationen ermittelt (Abb.15). Für die folgenden Versuche wählten wir die Endkonzentration von 10^{-4}M, da bei höheren Konzentrationen eine unphysiologisch starke Anreicherung von Uroporphyrin eintrat.

Nach Eisenzusatz wurde aus exogener δ-Aminolävulinsäure etwa 43% mehr Protohämin, aber wesentlich weniger Porphyrine als in den Kontrollkulturen synthetisiert. Die größte Porphyrinfraktion mit etwa 50% war nach Eisenapplikation Koproporphyrin, während die Porphyrine mit 7, 6 und 5 Carboxylgruppen nur in Spuren auftraten. Durch Zusatz von o-Phenanthrolin konnte der Einfluß des Eisens wiederum weitgehend aufgehoben werden (Tab.11).

b) Vergleichende Untersuchungen mit E.coli, Ps.aeruginosa und Rhodopseudomonas spheroides

E.coli und Ps.aeruginosa wurden unter den gleichen biochemischen und physikalischen Bedingungen wie A.metalcaligenes inkubiert, während Rhodopseudomonas spheroides im gleichen Medium, aber unter etwas abgeänderten Bedingungen kultiviert wurde (vgl.S.9).

Bei Synthese aus endogener δ-Aminolävulinsäure trat in den beiden

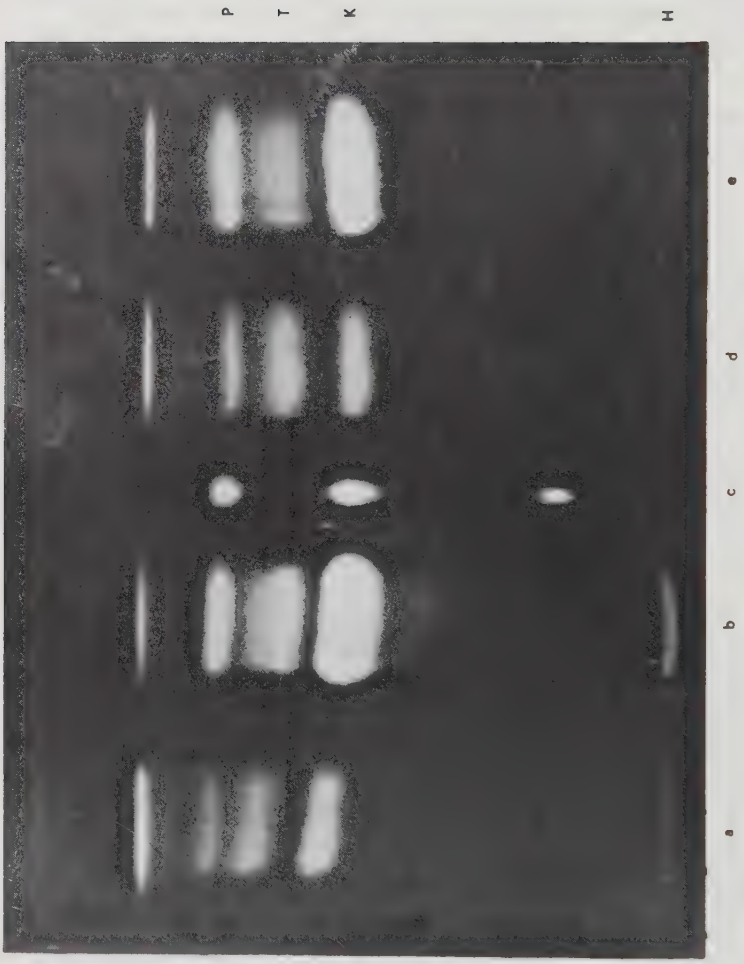

Abb. 16. Kieselgel- Dünnschichtchromatogramm mit Methylestern von Porphyrinen und Häm aus den Kulturen von E. coli (a,b) und Ps. aeruginosa (d,e) nach Inkubation in Lactat/Fumarat-Medien. Analyse der Gesamtkulturen. a,d = Zusatz von Eisen-(III)-citrat (10^{-5} M), c = Testsubstanzen, b,e = Vergleichskulturen. H = Häm, K = Kopro-, T = Tricarboxy-, P = Protoporphyrin.

Tab. 13. Porphyrin- und Hämsynthese von E. coli (1) und Ps. aeruginosa (2) aus Lactat/Fumarat (je 20 mM) unter dem Einfluß von Eisen-(III)-citrat (10^{-5} M) .

Spezies	Eisen	Wachstum (mg/ml)	Häm --(pMol/mg)--	Gesamt - porphyrine --(pMol/mg)--	Anteil der Einzelfraktionen (%) Kopro	3 COOH	Proto
1	-	0,51	38,7	18,9	57,4	24,2	18,4
	+	0,48	60,1	8,2	29,0	37,3	33,7
2	-	0,64	27,3	51,9	82,5	10,3	7,2
	+	0,60	58,9	20,8	72,3	12,8	14,8

Tab. 14. Einfluß von Eisen-(III)-citrat (10^{-5} M) auf die Porphyrin- und Hämsynthese aus exogener δ-Aminolävulinsäure (10^{-4} M) von E. coli (1) und Ps. aeruginosa (2).

Spezies	Eisen	Wachstum (mg/ml)	Häm	Gesamt-porphyrine	Anteil der Einzelfraktionen (%)						
			--(pMol/mg)--		Uro	7 COOH	6 COOH	5 COOH	Kopro	3 COOH	Proto
1	-	0,50	50,8	297,4	20,6	6,5	4,5	11,1	46,4	7,1	3,8
	+	0,49	97,8	189,1	20,3	8,7	5,6	16,8	37,7	6,8	4,1
2	-	0,68	46,7	1874	60,2	10,6	5,6	3,6	15,7	2,2	2,1
	+	0,69	92,0	1250	66,4	10,1	4,0	4,7	9,9	1,8	3,0

Tab. 15. Einfluß von Eisen-(III)-citrat (10^{-5} M) und exogener δ-Aminolävulinsäure (ALS) (10^{-4} M) auf die Porphyrin- und Hämsynthese von Rhodopseudomonas spheroides.

Zusätze		Wachstum	Häm	Gesamt - porphyrine	Anteil der Einzelfraktionen (%)						
ALS	Eisen	(mg/ml)	--(pMol/mg)--		Uro	7 COOH	6 COOH	5 COOH	Kopro	3 COOH	Proto
-	-	0,177	44,3	122,9	24,7	6,3	1,8	5,6	53,2	5,2	3,2
-	+	0,152	85,3	94,4	29,9	5,1	1,1	5,7	48,3	5,1	4,8
+	-	0,159	56,4	770,5	78,5	1,7	0,8	2,5	13,9	0,8	1,8
+	+	0,153	102,3	210,2	48,2	12,0	7,3	11,1	19,4	4,8	2,2

heterotrophen Spezies, die auch im Verteilungsmuster der übrigen Porphyrine weitgehende Übereinstimmung zeigten, als dominierende Porphyrinfraktion Koproporphyrin auf (&Abb.15) Nach Zusatz von Eisen nahmen die Koproporphyrinkonzentrationen zugunsten eines größeren Protoporphyrinanteils ab. Gleichzeitig wurde unter Eisen fast doppelt soviel Protohämin synthetisiert, während der Gehalt an Porphyrinen sich bei E.coli um 57% und bei Ps.aeruginosa um 59% verringerte (Tab.14).

Auch nach Zugabe von exogener ε-Aminolävulinsäure war in beiden Spezies unter Eisen die Gesamtsynthese an Porphyrinen erheblich verringert. Wiederum begünstigte Eisen die Konvertierung von Koproporphyrinogen zu Protoporphyrin (Tab15).

Obwohl die Zellen von Rhodopseudomonas spheroides, um gleiche biochemische Bedingungen voraussetzen zu können, nicht in einem optimalen Milieu (vgl. VAN NIEL[146]) kultiviert wurden, bildeten sie erhebliche Mengen an Porphyrinen. Bei der Synthese aus endogener wie exogener δ-Aminolävulinsäure stimmten die Relationen der einzelnen Porphyrinfraktionen weitgehend mit dem Verteilungsmuster bei Ps.aeruginosa überein (Tab.16). In gleicher Weise änderten sich auch die Porphyrinkonzentrationen nach Zusatz von Eisencitrat. Hier war selbst unter unseren Bedingungen eine auffällige Anreicherung von Protoporphyrin zu beobachten, die auch LASCELLES[103] beschrieben hatte.

c) Diskussion

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen an Bakterienzellen[17,112] und Kaninchenretikulocyten[93,143,194] zeigte es sich, daß der Hauptangriffspunkt der Eisenwirkung in einer Hemmung der δ-Aminolävulinsäure-Synthase zu suchen ist. Da in allen vier Spezies die Häminkonzentrationen regelmäßig direkt proportional zum Eisengehalt des Mediums anstiegen, liegt es nahe, anzunehmen, daß dem Hämin ein wesentlicher Anteil einer Repressorfunktion im Sinne einer "feedback-inhibition" zukommt, wie es an Enzympräparationen aus Rhodopseudomonas spheroides[112]

und Spirillum itersonii[17] gezeigt werden konnte.

Zwar gelang es bisher nicht, die Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthase in einer unserer drei heterotrophen Spezies zu bestimmen. Dennoch können die höheren δ -Aminolävulinsäurekonzentrationen der ohne Eisenzusatz inkubierten Kulturen als deutlicher Hinweis für eine höhere Aktivität des Enzyms in diesen Zellen gewertet werden.

Da trotz Umgehung der δ -Aminolävulinsäure-Synthase durch die Applikation exogener δ -Aminolävulinsäure das durch Eisen verursachte Synthesedefizit niemals voll ausgeglichen werden könnte, dürfte auch die δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase durch Protohämin gehemmt werden. An Zellextrakten von Rhodopseudomonas spheroides konnten BULL und LASCELLES[14] die Funktion einer zusätzlichen Regulationsstufe an der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase nachweisen.

Im Hinblick auf die Konstellation der gebildeten Porphyrine wichen die Verhältnisse bei A.metalcaligenes deutlich von den bisher vorliegenden Ergebnissen ab. In Kulturen verschiedener Athiorodaceae[104,109] sowie in Suspensionen von Tetrahymena vorax[105] begünstigt Eisen die Konvertierung von Koproporphyrinogen zu Protoporphyrin. Auch bei Saccharomyces anamensis[185] forciert Eisen die Protoporphyrinbildung. Wie aber aus der prozentualen Verteilung der Porphyrine in A.metalcaligenes bei Synthese aus endogener wie exogener δ -Aminolävulinsäure hervorgeht, ist hier in Kulturen ohne Eisenzusatz der Anteil von Protoporphyrin erheblich größer als in mit Eisen inkubierten Systemen. Sicherlich wird durch Eisen in vermehrtem Maße Protoporphyrin in Häm überführt, dennoch bleibt die jetzt eigentlich zu erwartende Metabolisierung von Koproporphyrinogen zu Protoporphyrin aus. Es tritt sogar eine Kumulation von Koproporphyrin ein, die nach Verminderung des Eisengehaltes durch die Applikation von o-Phenanthrolin zurückgeht. Damit ist die Bildung von Protoporphyrin, der stärksten Porphyrinfraktion bei A.metalcaligenes, nicht nur unabhängig von einer "Eisenkatalyse", wie sie von LASCELLES[103] postuliert wird, sondern

Eisen oder Hämin scheinen an einer Hemmung der Koproprphyrinogen-Oxydase in diesem Organismus maßgeblich beteiligt zu sein.

Ähnliche Verhältnisse fanden sich bei Euglena gracilis[15,92], wo Protoporphyrin in normal oder mit geringen Eisenzusätzen kultivierten Zellen den Hauptanteil der Porphyrine stellt. Die Überführung von Koproporphyrinogen in Protoporphyrin erwies sich als vom Eisengehalt vollkommen unabhängig. Ebenso war der Gehalt an Protoporphyrin in Blättern von Futtererbsen[123,124], die mit Eisenzusätzen angezogen worden waren, geringer als in Blättern von Kontrollpflanzen. Normale Blätter von Nicotina tabacum wiesen wesentlich höhere Einbauraten von δ-Aminolävulinsäure in Protoporphyrin auf, als die Blätter von mit Eisensalzen angezogene Pflanzen[84].

Dagegen gehen die Ergebnisse mit E.coli, Ps.aeruginosa und Rhodopseudomonas spheroides mit der "Koproporphyrinogen-Hypothese" von LASCELLES konform. In allen Kulturen war Koproporphyrin das mengenmäßig stärkste Porphyrin, dessen Konzentrationen unter Eisen zugunsten von Protoporphyrin abfielen. Damit liegen zwei gegenläufige Reaktionstypen vor, deren Ursache in einer unterschiedlichen Aktivität und Beeinflußbarkeit der Koproporphyrinogen-Oxydase zu suchen sind. Ob hier wirklich das Eisenion eine Hemmung oder Stimulierung der Enzymaktivität auslöst, wie es LASCELLES[103] vermutet oder dem Häm der wesentliche Anteil der Repressorfunktion zukommt, kann nach dem augenblicklichen Wissensstand nicht entschieden werden.

Hingegen ist eindeutig erwiesen, daß Hämin über eine "feedback-inhibition" der δ-Aminolävulinsäure-Synthase und der δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase seine eigene Synthese reguliert. An den entsprechenden Enzympräparationen[14,107] wurden ebenfalls deutliche, wenn auch geringere Hemmeffekte mit Protoporphyrin, Hämoglobin und Myoglobin erzielt. Auch nach Zusatz von Chelatkomplexen des Protoporphyrins mit Kobalt, Kupfer, Zink, Mangan und Magnesium konnten geringere Enzymaktivitäten gemessen werden. Diese Möglichkeit einer "false feedback-inhibition" wurde auch für die Biosynthese des Tryptophans beschrieben[135,136,189].

Auch über eine Hemmung der Proteinsynthese und damit der Neubildung spezifischer Enzymproteine ließ sich der Anteil des Hämins an der Repressorfunktion zeigen. Dies konnte einerseits durch Applikation von Antibiotika[13,50], andererseits durch Verwendung auxotropher Mutanten[166,179], denen die essentiellen Aminosäuren entzogen wurden, erreicht werden. In beiden Fällen scheint das freie kumulierende Häm, das als prosthetische Gruppe nun keine Bindung mit dem Apoenzym eingehen kann, die Porphyrinsynthese zu drosseln. Dieser Effekt ließ sich mit o-Phenanthrolin weitgehend aufheben[110]. Die enge Korrelation der Protein- und Tetrapyrrolsynthese tritt unter extremem Eisenmangel auch bei höheren Pflanzen in Erscheinung, wo neben der Tetrapyrrolsynthese auch die Bildung von Thylakoidproteinen zum Erliegen kommt, was Veränderungen der Chloroplastenstrukturen zur Folge hat[100,101].

Auch das Eisenion selbst scheint an einer direkten Hemmung der Porphyrinsynthese beteiligt zu sein, wie unsere Versuche mit steigenden Eisencitratkonzentrationen bei A.metalcaligenes zeigen (Tab.10). In Anreicherungen der δ-Aminolävulinsäure-Synthase und der δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase aus Rhodopseudomonas spheroides[14] und Ochsenleber[61] wurden nach Zugaben von Eisenionen geringere Aktivitäten ermittelt. Bei frischen δ-Aminolävulinsäure-Synthasepräparaten aus Hühnererythrozyten[11] zeigten Eisensalze den gleichen Effekt. Dagegen wurde die Synthase in älteren Präparaten der gleichen Versuchsserie sowie in Extrakten aus Entenerythrozyten[63] durch Eisenionen stimuliert. Keinen Einfluß zeigte das Eisen auf die Aktivität der δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase in Propionibacterium shermanii[137].

Zumindest in der Warmblüterzelle scheint auch der Effekt des Hämin auf die δ-Aminolävulinsäure-Synthase nicht einheitlich zu sein. Während die Aktivität des Enzyms aus Kaninchenretikulocyten[93,194] durch Häm erheblich gehemmt wurde, konnte an Präparaten aus Knochenmarkszellmitochondrien[10] keine Hemmung beobachtet werden. NEUWIRT et al.[142,143] nahmen daher an, daß in einigen Zelltypen Häm direkt auf Membranstrukturen einwirkt, womit der Eintritt von Eisen gesteuert werden könnte.

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach einer Übersicht über Vorkommen und Biosynthese der zyklischen Tetrapyrrole wird auf die noch nicht geklärten Fragen zur Regulation der Biosynthese in heterotrophen Bakterien hingewiesen und die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen erläutert.

2. Als mikrobielles System wurden profilierende, in einigen Fällen auch resuspendierende Kulturen von Achromobacter metalcaligenes in definierten und komplexen Medien verwandt. Zu vergleichenden Untersuchungen wurden Kulturen von Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa und Rhodopseudomonas spheroides herangezogen. Die Bestimmung der als Methylester dünnschichtchromatographisch aus gefriergetrocknetem Material isolierten Tetrapyrrole erfolgte meistens spektrophotometrisch. Kleine Porphyrinmengen wurden fluorometrisch direkt auf dem Dünnschichtchromatogramm registriert. Der Cytochromgehalt von Achromobacter metalcaligenes wurde auch in intakten Zellen spektrophotometrisch analysiert. δ-Aminolävulinsäure wurde säulenchromatographisch isoliert, zyklisiert und nach Bildung eines Farbkomplexes mit Ehrlichs-Quecksilberreagens spektrophotometrisch bestimmt. Die Ermittlung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte mit Pyruvat und NADH spektrophotometrisch anhand der abnehmenden NADH-Konzentration.

3. A.metalcaligenes synthetisiert alle bekannten Porphyrine einschließlich eines Tricarboxyporphyrins sowie Cytochrom b. Bei länger dauernder Inkubation mit exogener δ-Aminolävulinsäure treten kleine Mengen an Zink-Chelaten von Uro- und Koproporphyrin auf. Im Gegensatz zu den anderen Spezies ist Protoporphyrin die quantitativ stärkste Porphyrinfraktion. Das Verhältnis der Syntheseraten aus endogener δ-Aminolävulinsäure zwischen E.coli, Ps.aeruginosa und A.metalcaligenes beträgt für die Porphyrinbildung 5 : 1 : 1 und für die Hämsynthese 1 : 1, 8 : 2,4. Zusatz exogener δ-Aminolävulinsäure löst bei A.metalcaligenes und E.coli eine 20-fache, bei Ps.aeruginosa eine 12 fache Mehrsynthese an Prophyrinen und eine zwei- bis dreifache Steigerung

der Hämbildung aus. Die δ-Aminolävulinsäure-Synthase scheint als "rate-limiting-enzyme" zu fungieren.

4. Bei Synthese aus endogener δ-Aminolävulinsäure wird hauptsächlich Koproporphyrin in das Kulturmedium abgegeben, während nach Inkubation mit exogener δ-Aminolävulinsäure sämtliche Porphyrine ausgeschieden werden. Die Porphyrine mit 8 bis 5 Carboxylgruppen waren zu 70-98%, Tricarboxyporphyrin zu 50% und Protoporphyrin zu 20% im Medium zu finden. Ein geringer Anteil des Protohämins trat ebenfalls ins Medium über.

5. Während eines Wachstumszyklus kumuliert als erstes Tetrapyrrol das Häm; darauf folgen Protoporphyrin und später Koproporphyrin. Nachdem die Konzentrationen relativ früh maximale Werte erreicht haben, zeigen sie während der weiteren Inkubation einen asymptotischen Verlauf. Die Porphyrine mit 8 bis 5 Carboxylgruppen, die bei Synthese aus δ-Aminolävulinsäure nur in Spuren auftreten, reichern sich bei Synthese aus exogener δ-Aminolävulinsäure in stetig zunehmenden Konzentrationen während der ganzen Inkubationsperiode an. Sobald eine bestimmte Hämkonzentration erreicht ist, scheint eine Hemmung der δ-Aminolävulinsäure-Synthase und damit des gesamten Syntheseablaufs einzutreten. Für die Bildung von Kopro- und Protoporphyrin scheint eine zusätzliche Regulation im Sinne einer "feedback-inhibition" auf die dem Reaktionsprodukt jeweils vorgeordneten Enzyme hinzuzutreten.

6. In Abhängigkeit von dem Substratangebot variiert das Ausmaß der Tetrapyrrolsynthese erheblich. Glutamat sowie die meisten Substrate des Tricarbonsäurezyklus ermöglichen die größten Syntheseraten. Mit L-Lactat oder der Kombination von L-Lactat und Fumarat war das Wachstum optimal. Mit Glycin, Glycerin, Citrat, Isocitrat und α-Ketoglutarat trat kein Wachstum auf. Im Lactat-Fumarat-Medium bildet A.metalcaligenes 50% mehr Porphyrine und 8-fach höhere Hämkonzentrationen als im komplexen Medium. Die Mehrsynthese an Tetrapyrrolen durch Zellen, die in komplexen Medien angezüchtet worden waren und dann in Lactat-Medium umgesetzt wurden, konnte durch Puromycin unterdrückt werden. Wahr-

scheinlich handelt es sich hierbei um eine echte Induktion im Sinne einer Neusynthese von Enzymen, die bei diesen konstitutiven Enzymen nicht die Ausmaße wie bei induzierbaren Enzymen annimmt. Gleichsinnige Ergebnisse wurden mit E.coli erhalten.

7. Mit abnehmender Belüftung wird die Synthese der Tetrapyrrole, insbesondere von Häm und Protoporphyrin, forciert.

8. Zusatz von Eisen-(III)-citrat hemmt in stiegenden Konzentrationen kontinuierlich die Bildung von Porphyrinen bei gleichzeitiger Steigerung der Hämsynthese. Wie ein Vergleich der Syntheseraten von δ-Aminolävulinsäure ergibt, scheint hierfür in erster Linie die Hemmung der δ-Aminolävulinsäure-Synthase verantwortlich zu sein, an der Häm den entscheidenden Anteil haben dürfte. Da in den getesteten vier Spezies durch Zusetzen von exogener δ-Aminolävulinsäure das Synthesedefizit unter Eisen nicht voll ausgeglichen werden kann, wird eine zusätzliche Hemmung der δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase angenommen. Mit o-Phenanthrolin wird der Effekt des Eisens weitgehend aufgehoben. Bei A.metalcaligenes wirkt die Applikation von Eisen im Sinne einer Aktivierung der Umwandlung von Koproporphyrinogen zu Protoporphyrin. Neben der indirekten Wirkung über Protohämin übt das Eisenion in höheren Konzentrationen auch direkt einen hemmenden Einfluß auf die Synthese aus.

9. Die Ergebnisse zeigen, daß die Tetrapyrrolbiosynthese und ihre Regulation in den untersuchten heterotrophen Bakterien Analogien zu den an tierischen und phototrophen pflanzlichen Zellen gewonnenen Erkenntnissen zeigt. Es erweist sich aber als erforderlich, die bei den einzelnen Spezies unterschiedliche quantitative Ausstattung an spezifischen Enzymen zu berücksichtigen. Die hieraus sich ergebenden Verteilungsmuster der einzelnen Porphyrinfraktionen innerhalb einer Kultur bleiben auch bei Änderung der physiologischen Parameter erhalten. Unter Berücksichtigung der erarbeiteten Ergebnisse wäre es denkbar, heterotrophe Bakterien zur Erzeugung von Porphyrinen als Testsubstanzen oder Ausgangsstoffen für weitere Synthesen einzusetzen oder als Versuchssysteme für die porphyrinogene Wirkung von Pharmaka und anderen körpereigenen und körperfremden Verbindungen heranzuziehen.

E. LITERATUR

1. APPLEBY, C.A. und R.K. MORTON: Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast. Biochem.J. 71 (1959) 492-499.

2. ATKINSON, D.E.: Regulation of enzyme activity. Ann.Rev.Biochem. 35 (1966) 85-124.

3. AUTERHOFF, H.: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. 2.Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H. Stuttgart 1964.

4. BERGMEYER, H.U. und E. BERNT: Lactat-Dehydrogenase, UV-Test mit Pyruvat und NADH, in: Methoden der enzymatischen Analyse, herausg. v. H.U. BERGMEYER. 2.Aufl. Bd.1. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1970, S. 533-538.

5. BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION: Temperature conversion tables. New York 1970.

6. BLOCH, K. und D. RITTENBERG: An estimation of acetic acid formation in the rat. J.Biol.Chem. 159 (1945) 45-58.

7. BOGORAD, L.: The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. I.Uroporphyrin I. J.Biol.Chem. 233 (1958) 501-509.

8. BOGORAD, L.: The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. II.Uroporphyrin III. J.Biol.Chem. 233 (1958) 510-515.

9. BOGORAD, L. und S.GRANICK: The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 39 (1953) 1176-1188.

10. BOTTOMLEY, S.S. und G.A. SMITHEE: Characterisation and measurement of δ-aminolaevulinate synthetase in bone morrow cell mitochondria. Biochem.Biophys.Acta 159 (1968) 27-37.

11. BROWN, E.G.: Evidence for the involvement of ferrous ions in the biosynthesis of δ-aminolaevulic acid by chicken erythrocyte preparations. Nature 182 (1958) 313-315.

12. BRUGSCH, J.: Porphyrine. Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, 1959.

13. BULL, M.J. und J. LASCELLES: The association of protein synthesis with the formation of pigments in some photosynthetic bacteria. Biochem.J. 87 (1963) 15-28.

14. BURNHAM, B.F. und J. LASCELLES: Control of porphyrin biosynthesis through a negative - feedback mechanism. Biochem.J. 87 (1963) 462-472.

15. CARELL, E.F. und C.A. PRICE: Porphyrins and the iron requirement for chlorophyll formation in Euglena. Plant Physiol. 40 (1965) 1-7.

16. CHU, T.C. und E.J.-H. CHU: Porphyrin pattern in different types of porphyria. Clin.Chem. 13 (1967) 371-374.

17. CLARK-WALKER, G.D., D. RITTENBERG und J. LASCELLES: Cytochrome synthesis and its regulation in Spirillum itersonii. J.Bact. 94 (1967) 1648-1655.

18. COHEN, G.: Regulation of enzyme activity in microorganisms. Ann.Rev.Microbiol. 19 (1965) 105-126.

19. COLLINS, F.M. und J. LASCELLES: The effect of growth conditions on oxidative and dehydrogenase activity in Staphylococcus aureus. J.Gen.Microbiol. 29 (1962) 531-535.

20. CONNEY, A.H. und A.G. GILMAN: Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. J.Biol. Chem. 238 (1963) 3682-3685.

21. CORNALL, A.G., C.J. BARDAWILL und M.M. DAVID: Determination of serum proteins by means of the biuret reaktion. J.Biol.Chem. 177 (1949) 751-766.

22. CRAWFORD, L.V.: Studies on the aspartic decarboxylase of Nocardia globerula. Biochem.J. 68 (1958) 221-225.

23. CREASER, E.H.: The induced biosynthesis of β-galactosidase in Staphylococcus aureus. J.Gen.Microbiol. 12 (1955) 288-297.

24. DENNIS, D. und N.O. KAPLAN: D- and L-lactic acid dehydrogenases in Lactobacillus plantarum. J.Biol.Chem. 235 (1960) 810-818.

25. DORFNER, K.: Ionenaustauscher. 3.Aufl. Walter de Gruyter, Berlin 1970.

26. DOSS, M.: The quantitative separation of porphyrins and protohaemin as methylesters by thin-layer-chromatography. J.Chromatogr. 30 (1967) 265-269.

27. DOSS, M.: Effects of inducer substances on porphyrin synthesis in liver cell cultures. FEBS Letters 2 (1968) 127-129.

28. DOSS, M.: Spektrophotometrische Messung von Porphyrinmethylester-Cu-Chelaten. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 6 (1968) 498-499.

29. DOSS, M.: Die Bildung von Pyridinhämochromogen aus Protohäminmethylester. Klin.Wschr. 46 (1968) 731-732.

30. DOSS, M.: Porphyrin- und Hämsynthese bei Achromobacter metalcaligenes unter dem Einfluß von 2-Methyl-2-n-propyl-1,3-propandioldicarbamat. Biochim.Biophys.Acta 170 (1968) 461-464.

31. DOSS, M.: Über die Porphyrinsynthese in der Leberzellkultur unter der Einwirkung von Pharmaka und Steroiden. Z.Klin.Chem. Z.Klin.Biochem. 7 (1969) 133-147.

32. DOSS, M.: Trennung, Isolierung und Bestimmung von Proto-, Kopro-, Pentacarboxy-, Hexacarboxy-, Heptacarboxy- und Uroporphyrin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 350 (1969) 499-502.

33. DOSS, M.: Porphyrinanalyse im Leberzylinder bei Porphyria cutanea tarda. Klin.Wschr. 47 (1969) 1280-1282.

34. DOSS, M.: Fluorescens Analysis of Porphyrins in thin-layer chromatograms. Z.Anal.Chem. 252 (1970) 104-111.

35. DOSS, M.: Die Porphyrine in der Leber und im Urin bei Porphyria cutanea tarda. Dtsch.med.Wschr. 95 (1970) 959-960.

36. DOSS, M.: Analytical and preparative thin-layer chromatography of porphyrin methyl esters. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 8 (1970) 197-207.

37. DOSS, M.: Formation of zinc chelates from porphyrin methyl esters for spektrophotometric analysis. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 8 (1970) 208-211.

38. DOSS, M.: Habilitationsschrift, Marburg/Lahn, 1969.

39. DOSS, M. und U.BODE: Dünnschichtchromatographische Trennung von Porphyrinen, Hämin und Lipoiden auf Kieselgel-H-Platten zur Bestimmung der Erythrozytenporphyrine als Methylester. J.Chromatogr. 35 (1968) 248-256.

40. DOSS, M. und W. MANNHEIM: Protoporphyrin und Hämin in Kulturfiltraten von Achromobacter metalcaligenes. Experientia 23 (1967) 31-33.

41. DOSS, M., W. MEINHOF, C.-P. SODOMANN und W. DÖLLE: Charakteristische Konstellation der Urinporphyrine als biochemischer Index der Porphyria cutanea tarda. Klin.Wschr. 48 (1970) 1132-1134.

42. DOSS, M. und W.-K. PHILIPP: Zwei einfache spezifische Methoden zur Bestimmung der Urinporphyrine. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 7 (1969) 148-151.

43. DOSS, M. und W.K. PHILIPP-DORMSTON: The influence of iron on the biosynthesis of porphyrins and the prosthetic group of cytochrome b in Achromobacter metalcaligenes. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352 (1971) 43-51.

44. DOSS, M. und W.K. PHILIPP-DORMSTON: Excretion of porphyrins by bacteria. Experientia 27 (1971) 376-377.

45. DOSS, M. und W.K. PHILIPP-DORMSTON: Porphyrin and heme biosynthesis from endogenous and exogenous δ-aminolevulinic acid in Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Achromobacter metalcaligenes. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352 (1971) 725-733.

46. DOSS, M., B. ULSHÖFER und R. QUAST: Fluorometrische Bestimmung von Porphyrinmethylestern im Dünnschichtchromatogramm. J.Chromatogr. 41 (1969) 386-393.

47. DRESEL, E.I.B. und J.E. FALK: Conversion of δ-aminolaevulic acid to porphobilinogen in a tissue system. Nature 172 (1953) 1185-1185.

48. DRESEL, E.I.B. und J.E. FALK: Studies on the biosynthesis of blood pigments. 1. Haem synthesis in haemolyzed erythrocytes of chicken blood. Biochem.J. 56 (1954) 156-163.

49. DRESEL, E.I.B. und J.E. FALK: Studies on the biosynthesis of blood pigments. 3. Haem and porphyrin formation from δ-aminolaevulic acid and from porphobilinogen in haemolyzed chicken erythrocytes. Biochem.J. 63 (1956) 80-87.

50. DREWS, G.: Untersuchungen zur Regulation der Bacteriochlorophyll-Synthese bei Rhodospirillum rubrum. Arch.Mikrobiol. 51 (1965) 186-198.

51. FALK, J.E.: Chemistry and biochemistry of porphyrins and metalloporphyrins, in: Comprehensive Biochemistry, herausg. v. M. FLORKIN und E.H. STOTZ, Bd.9. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1963, S. 3-33.

52. FALK, J.E.: Porphyrins and metalloporohyrins. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1964.

53. FALK, J.E., E.I.B. DRESEL und C. RIMINGTON: Porphobilinogen as a precursor, and interconversion of porphyrins, in a tissue system. Nature 172 (1953) 292-294.

54. FALK, J.E., R.J. PORRA, A. BROWN, F. MOSS und H.E. LARMINIE: Effect of oxygen tension on haem and porphyrin biosynthesis. Nature 184 (1959) 1217-1219.

55. FINK, H.: Über die Koproporphyrie der Hefe. Biochem. Ztschr. 211 (1929) 65-130.

56. FISCHER, H., H. HILMER, F. LINDNER und B. PÜTZER: Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine. XVIII.Mitteilung. Chemische Befunde bei einem Fall von Porphyrinurie (Petry). Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 150 (1925) 44-101.

57. FISCHER, H. und H. ORTH: Die Chemie des Pyrrols. II.Bd., Pyrrolfarbstoffe, 1.Hälfte. Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1937.

58. FISCHER, H. und A. STERN: Die Chemie des Pyrrols. II.Bd., Pyrrolfarbstoffe, 2.Hälfte. Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig,1940.

59. FISCHER, H. und K. ZEILE: Synthese des Hämatoporphyrins, Protoporphyrins und Hämins. Ann.Chem. 468 (1929) 98-116.

60. FISCHER, H. und W. ZERWECK: Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine. V. Mitteilung. Über Koproporphyrin in Harn und Serum unter normalen und pathologischen Bedingungen. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 132 (1924) 12-33.

61. GIBSON, K.D., A. NEUBERGER und J.J. SCOTT: The purification and properties of δ-aminolaevulic acid dehydrase. Biochem.J. 61 (1955) 618-629.

62. GIBSON, K.D., W.G. LAVER und A. NEUBERGER: Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 2. The formation of δ-aminolaevulic acid from glycin and succinyl-coenzym A by particles from chicken erythrocytes. Biochem.J. 70 (1958) 71-81.

63. GORECZKY, L., I.ROTH und M. BRECKNER: Normalwerte der Porphyrine und Porphyrinvorstufen. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 6 (1968) 489-492.

64. GRANICK, S.: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. I. Formation of δ-aminolaevulic acid in erythrocytes. J.Biol.Chem. 232 (1958) 1101-1117.

65. GRANICK, S.: Induction of the synthesis of δ-aminolaevulic acid synthetase in liver parenchymal cells in culture by chemicals that induce acute porphyria. J.Biol.Chem. 238 (1963) 2247-2249.

66. GRANICK, S.: The induction in vitro of the synthesis of δ-aminolaevulic acid synthetase in chemical porphyria: A response of certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. J.Biol.Chem. 241 (1966) 1359-1375.

67. GRANICK, S. und H. GILDER: The porphyrin requirements of Haemophilus influenzae and some functions of the vinyl and propionic acid side chains of heme. J.Gen.Physiol. 30 (1946/47) 1-13.

68. GRANICK, S. und A. KAPPAS: Steroid induction of porphyrin synthesis in liver cell cultures. J.Biol.Chem. 242 (1967) 4587-4593.

69. GRANICK, S. und D. MAUZERALL: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting δ-aminolaevulinic acid to coproporphyrinogen. J.Biol.Chem. 232 (1958) 1119-1140.

70. GRANICK, S. und D. MAUZERALL: Enzymatic formation of protoporphyrin from coproporphyrinogen III. Fed.Proc. 17 (1958) 233-233.

71. GRANICK, S. und G. URATA: Increase in activity of δ-aminolaevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5- dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine. J.Biol.Chem. 238 (1963) 821-827.

72. GRAY, C.H.: Klinische Biochemie, dtsch.Überse tzung v. U. FELDMANN. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1967.

73. GRAY, C.H. und L.B. HOLD: The isolation of coproporphyrin III from Corynebacterium diphtheriae culture filtrates. Biochem.J. 43 (1948) 191-193.

74. GRAY, C.T., J.W.T. WIMPENNY, D.E. HUGHES und M.R. MOSSMAN: Regulation of metabolism in facultativ bacteria. I. Structural and functional changes in Escherichia coli associated with shifts between the aerobic and anaerobic states. Biochim. Biophys.Acta 117 (1966) 22-32.

75. GÜNTHER, H.: Die Hämatoporphyria. Dtsch.Arch.Klin.Med. 105 (1911) 89-146.

76. HEIKEL, T., W.H. LOCKWOOD und C. RIMINGTON: Formation of non-enzymic haem. Nature 182 (1958) 313-314.

77. HEILMEYER, L., R. CLOTTEN und L. HEILMEYER jr.: Die Störungen der Bluthämsynthese mit besonderer Berücksichtigung der sideroachrestischen Anämien und erythropoetischen Porphyrien. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964.

78. HEMPELMANN, F. und O. ZUR STRASSEN: Die Vögel, Bd.II, in: Brehms Tierleben, herausg. v. O. ZUR STRASSEN, Bibliograph. Institut, Leipzig, 1922, S. 471-475.

79. HERBERT, F.D.: Porphyrins excreted in various types of porphyria. Clin.chim.Acta 13 (1966) 19-23.

80. HIGUCHI, M., K. GOTO, M. FUJIMOTO, O. NAMIKI und G. KIKUCHI: Effect of inhibitors of nucleic acid and protein synthesis on the induced synthesis of bacteriochlorophyll and δ-aminolevulinic acid synthetase by Rhodopseudomonas spheroides. Biochim.Biophys. Acta 95 (1965) 94-110.

81. HILL, R. und E.F. HARTREE: Hematin compounds in plants. Ann.Rev. Pl.Physiol. 4 (1953) 115-150.

82. HOARE, D.S. und H. HEATH: Intermediates in the biosynthesis of porphyrins from porphobilinogen by Rhodopseudomonas sphaeroides. Nature 181 (1958) 1592-1593.

83. HOPPE-SEYLER, F.: Medizinisch-chemische Untersuchungen. Tübingen, 1871.

84. HSU, W.-P. und W. MILLER: Chlorophyll and porphyrin synthesis in relation to iron in Nicotina tabacum,L. Biochim.Biophys.Acta 111 (1965) 393-402.

85. INHOFFEN, H.H., J.W. BUCHLER und P. JÄGER: Chemie der Chlorine und Porphyrine, in: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, herausg. v. L. ZECHMEITER, 26.Bd. Springer Verlag, Wien, 1968, S. 284-355.

86. JACOB, F. und J. MONOD: Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. J.Mol.Biol. 3 (1961) 318-356.

87. JACOBS, N.J., J.M. JACOBS und P. BRENT: Characterisation of the late steps of microbial heme synthesis: Conversion of coproporphyrinogen to protoporphyrin. J.Bact. 107 (1971) 203-209.

88. JACOBS, N.J., E.R. MACLOSKY und J.M. JACOBS: Role of oxygen and heme in synthesis and the development of hemoprotein activity in an anaerobically-grown staphylococcus. Biochim.Biophys.Acta 148 (1967) 645-654.

89. JACOBY, W.B. und E.M. SCOTT: Aldehyde oxidation. III. Succinic semialdehyde dehydrogenase. J.Biol.Chem. 234 (1959) 937-940.

90. JONES, R.G.W. und J. LASCELLES: The relationship of 4-hydroxybenzoic acid to lysin and methionin formation in Escherichia coli. Biochem.J. 103 (1968) 709-713.

91. KADENBACH, B.: Biosynthesis of cytochrome c. The sites of synthesis of apoprotein and holoenzyme. Eur.J.Biochem. 12 (1970) 392-398.

92. KARALI, E.F. und C.A. PRICE: Iron, porphyrins, and chlorophyll. Nature 198 (1963) 708-708.

93. KARIBIAN, D. und I.M. LONDON: Control of heme synthesis by feedback inhibition. Biochim.Biophys.Reserce Comm. 18 (1965) 243-249.

94. KAUFFMANN, F.: Enterobacteriaceae. 2.Aufl., Ejnar Munksgaard Publisher, Copenhagen, 1954.

95. KEULMANN, M.: Dissertation, Marburg/Lahn, 1968.

96. KORNBERG, H.L.: Anaplerotische Sequenzen im mikrobiologischen Stoffwechsel. Angew.Chemie 77 (1965) 601-609.

97. KORNBERG, H.L. und H.A. KREBS: Synthesis of cell constituents from C_2-units by a modified tricarboxylic cycle. Nature 179 (1957) 988-991.

98. KRANZ, S.B., O. GALLIEN-LARTIGUE und E. GOLDWASSER: The effect of erythropoitin upon heme synthesis by marrow cells in vitro. J.Biol.Chem. 238 (1963) 4085-4090.

99. LABBE, R.F., N. HUBBARD und W.S. CAUGHEY: Porphyrin spezifity of ferro: Protoporphyrin chelatase from rat liver. Biochemistry 2 (1963) 372-374.

100. LAMPRECHT, I.: Die Feinstruktur der Plastiden von Tradescantia albiflora (Kth.) bei Eisenmangelchlorose. I. Lichtmikroskopische Untersuchungen. Protoplasma 53 (1961) 118-147.

101. LAMPRECHT, I.: Die Feinstruktur der Platiden von Tradescantia albiflora (Kth.) bei Eisenmangelchlorose. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen. Protoplasma 53 (1961) 162-199.

102. LASCELLES, J.: The formation of porphyrins by photosynthetic bacteria, in: The biosy nthesis of porphyrins and porphyrin metabolism, Ciba Foundation, herausg. v. G.E.W. WOLSTENHOLME, J. and A. Churchill Ltd., London 1955, S. 265-281.

103. LASCELLES, J.: The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell suspensions of Rhodopseudomonas spheroides. Biochem.J. 62 (1956) 78-93.

104. LASCELLES, J.: Assay of iron protoporphyrin based on the reduction of nitrate by variant strains of Staph. aureus. Synthesis of iron protoporphyrin by suspensions of Rhodopseudomonas spheroides. J.Gen.Microbiol. 15 (1956) 404-416.

105. LASCELLES, J.: Synthesis of porphyrins by cell suspensions of Tetrahymena vorax: Effect of members of the vitamin B group. Biochem.J. 66 (1957) 65-72.

106. LASCELLES, J.: Adaption to form bacteriochlorophyll in Rhodopseudomonas spheroides: Changes in activity of enzymes concerned in pyrrol synthesis. Biochem.J. 72 (1959) 508-518.

107. LASCELLES, J.: The synthesis of enzymes concerned in bacteriochlorophyll formation in growing cultures of Rhodopseudomonas sheroides. J.Gen.Microbiol. 23 (1968) 487-498.

108. LASCELLES, J.: Tetrapyrrole synthesis in microorganisms, in: The bacteria, herausg. v. I.C. GUNSALUS und R.Y. STAINER, Bd. III. Academic Press, New York-London, 1962, S. 335-372.

109. LASCELLES, J.: Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation. W.A. Benjamin, IHC., New York-Amsterdam, 1964.

110. LASCELLES, J.: The regulation of heme and chlorophyll synthesis, in: Porphyrins and related compounds, Biochemical Society Symposium No. 28, herausg. v. T.W. GOODWIN. Academic Press, New York-London, 1968, S. 49-59.

111. LASCELLES, J.: The bacterial photosynthetic apparatus, in: Advances in microbial physiology, herausg. v. A.H. ROSE und J.F. WILKINSON, Bd.2. Academic Press, New York-London, 1968, S. 1-14.

112. LASCELLES, J. und T.P. HATCH: Bacteriochlorophyll and heme synthesis in regulation of the branched biosynthetic pathway. J.Bact. 98 (1969) 712-720.

113. LAVER, W.G., A. NEUBERGER und S. UNDENFRIEND: Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 1. The formation of δ-aminolaevulic acid by particles obtained from chicken erythrocytes. Biochem.J. 70 (1958) 4-14.

114. LENHOFF, H.M., D.J.D. NICHOLAS und N.O. KAPLAN: Effects of oxygen, iron, and molybdenum on routes of electrone transfer in Pseudomonas fluorescens. J.Biol.Chem. 220 (1965) 983-995.

115. LONDON, I.M., D. SHEMIN und D. RITTENBERG: Synthesis of heme in vitro by the immature nonnucleated mammalian erythrocyte. J.Biol.Chem. 183 (1950) 749-755.

116. MANNHEIM, W.: Untersuchungen über einen bakteriellen Haemophilus-X-Faktor. I. Nachweis, Produktion und Stabilität des Faktors in komplexen Medien. Zbl. Bakt.I.Orig. 198 (1965) 516-528.

117. MANNHEIM, W.: Untersuchungen über einen bakteriellen Haemophilus-X-Faktor. II. Verbreitung des Wuchsfaktors bei heterotrophen Bakterien. Zbl.Bakt.I.Orig. 200 (1966) 100-109.

118. MANNHEIM, W.: Limitierende Faktoren in Mischkulturen eines obligaten Aerobiers (Achromobacter metalcaligenes) mit Haemophilus influenzae resp. mit Aerobiern. Path.Microbiol. 29 (1966) 341-365.

119. MANNHEIM, W. und H. BÜRGER: Untersuchungen über einen bakteriellen Haemophilus-X-Faktor. III. Produktion des Wuchsfaktors in definierten Medien. Zbl.Bakt.I.Orig. 201 (1966) 344-356.

120. MANNHEIM, W. und M. DOSS: Einfluß von Adenosin (AD) und 3-Amino-1.2.4-triazol (AT) auf Wachstum und Porphyrinsynthese aus δ-Aminolävulinsäure (ALA) bei Achromobacter metalcaligenes. Z.Naturforschg. 22b (1967) 359-360.

121. MARINI-BETTOLO, G.B.: Thin-layer chromatography. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 1964.

122. MARRIOT, J.: Regulation of porphyrin synthesis, in: Porphyrins and related compounds, herausg. v. T.W. GOODWIN. Academic Press, New-York-London, 1968, S. 61-74.

123. MARSH, H.W., H.J. EVANS und G. MATRONE: Investigation of the role of iron in chlorophyll metabolism. I. Effect of iron deficiency on chlorophyll and heme content and on the activities of certain enzymes in leaves. Plant.Physiol. 38 (1963) 632-638.

124. MARSH, H.W., H.J. EVANS und G. MATRONE: Investigation of the role of iron in chlorophyll metabolism. II. Effect of iron deficiency on chlorophyll synthesis. Plant.Physiol. 38 (1963) 638-642.

125. DE MATTEIS, F. und C. RIMINGTON: Disturbance of porphyrin metabolism caused by griseofulvin in mice. Brit.J.Dermat. 75 (1963) 91-104.

126. DE MATTEIS, F.: Hypercholesteriolaemia and liver enlargement in experimental porphyria. Biochem.J. 98 (1966) 23c-25c.

127. MAUZERALL, D. und S. GRANICK: The occurence and determination of δ-aminolevulic acid and porphobilinogen in urine. J.Biol. Chem. 219 (1956) 435-446.

128. MAUZERALL, D. und S. GRANICK: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. III. Uroporphyrinogen and its decarboxylase. J.Biol.Chem. 232 (1958) 1141-1162.

129. MEDICUS, L. und W. POETHKE: Maßanalyse, 15.Aufl. Verlag Theodor Steinkopff, Dresden-Leipzig, 1958, S. 157.

130. MIE, G.: Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. Ann.Physik 25 (1908) 377-445.

131. MONOD, J.: Recherces sur la croissance des cultures bacteriennes. Herman, Paris, 1942.

132. MONOD, J.: The phenomen of enzymatic adaptions and its bearings on genetic and cellular differention. Growth 11 (1947) 223-289.

133. MONOD, J., J.-P. CHANGEUX und F. JACOB: Allosteric proteins and cellular control systems. J.Mol.Biol. 6 (1963) 306-329.

134. MONOD, J., J. WYMAN und J.-P. CHANGEUX: On the nature of allosteric transitions: A plausible model. J.Mol.Biol. 12 (1965) 88-112.

135. MOYED, H.S.: False feedback inhibition: Inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyltryptophan. J.Biol.Chem. 235 (1965) 1098-1102.

136. MOYED, H.S. und M. FRIEDMAN: Interference with feedback control: A mechanism of antimetabolite action. Science 129 (1959) 968-969.

137. MÜLLER, G. und G. BEZOLD: Gewinnung von Porphobilinogen aus δ-Aminolävulinsäure mit Zellsuspensionen von Propionibacterium shermanii. Z.Naturforschg. 24b (1969) 47-53.

138. MULDER, zit. nach GOLDBERG, A. und C.R. RIMINGTON: Diseases of porphyrin metabolism. Charles C Thomas, Springfield, Illinois, 1962.

139. NAKADA, D. und B. MAGASANIK: The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of β-galactosidase by Escherichia coli. J.Mol.Biol. 8 (1964) 105-127.

140. NEUBERGER, A. und J.J. SCOTT: Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis. Nature 172 (1953) 1093-1094.

141. NENCKI, M. und N. SIEBER: Über das Hämatoporphyrin. Arch. exper.Path.u.Pharmakol. 24 (1888) 430-446.

142. NEUWIRT, J., P. POŪKA und J. BOROVĀ: The role of heme in regulation of δ-aminolevulinic acid and heme synthesis in rabbit reticulocytes. Eur.J.Biochem. 9 (1969) 36-41.

143. NEUWIRT, J., P. POŪKA, J. BOROVĀ und J.F. PRCHAL: Problems of reduced heme synthesis in reticulocytes with impaired globin synthesis. Blut 19 (1969) 17-27.

144. NEVE, R.A., R.F. LABBE und R. ALDERICH: Reduced uroporphyrin III in the biosynthesis of heme. J.Am.Chem.Soc. 78 (1956) 691-692.

145. VAN NIEL, C.B.: The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. Bact.Rev. 8 (1944) 1-14.

146. VAN NIEL, C.B.: The chemoautothrophic and photosynthetic bacteria. Ann.Rev.Microbiol. 8 (1954) 105-132.

147. ONISAWA, J. und R.F. LABBE: Effects of diethyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine-3,5-dicarboxylate on the metabolism of porphyrins and iron. J.Biol.Chem. 238 (1963) 724-727.

148. OPARIN, A.J.: Das Leben-seine Natur, Herkunft und Entwicklung. Moskau 1960, dtsch. Übersetznug v. R. WITTWER, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1962.

149. ORRENIUS, S. und J.L.E. ERICSSON: Enzyme-membrane relationship in phenobarbital induction of synthesis of drug-metabolizing enzyme system and proliferation of endoplasmic membranes. J.Cell Biol. 28 (1966) 181-198.

150. OTSUKA,S., R. MIYAJIMA und I. SHIO: Comparativ studies on the mechanisms of microbial glutamat formation. I. Pathways of glutamate formation from glucose in Brevibacterium flavum and in Micrococcus glutamicus. J.Gen.Appl.Microbiol. 11 (1965) 285-301.

151. PAPPENHEIMER, A.M.: Diphtheria toxin. III. A reinvestigation of the effect of iron on toxin and porphyrin production. J.Biol.Chem. 167 (1947) 251-259.

152. PAPPENHEIMER, A.M. und E.D. HENDEE: Diphtheria toxin. IV. the iron enzymes of Corynebacterium diphtheria and their possible relation to diphtheria toxin. J.Biol.Chem. 171 (1947) 701-713.

153. PAUL, K.G., H. THEORELL und Å. ÅKENSON: The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen). Acta Chem.Scand. 7 (1953) 1284-1287.

154. PORRA, R.J. und J.E. FALK: The enzymic conversion of coproporphyrinogen III into protoporphyrin IX. Biochem.J. 90 (1963) 69-75.

155. PORRA, R.J. und J. LASCELLES: Haemoproteins and haem synthesis in facultative photosynthetic and denitrifying bacteria. Biochem.J. 94 (1965) 120-126.

156. PORRA, R.J. und O.T.G. JONES: Studies on ferrochelatase. 1. Assay and properties of ferrochelatase from pigliver mitochondrial extract. Biochem.J. 87 (1963) 181-185.

157. PORRA, R.J. und O.T.G. JONES: Studies on ferrochelatase. 2. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various haem prosthetic groups. Biochem.J. 87 (1963) 186-192.

158. POSTGATE, J.R.: Cytochrome c_3 and desulphoviridin; pigments of the anaerobe Desulphovibrio desulphuricans. J.Gen.Microbiol. 14 (1956) 545-572.

159. POSTGATE, J.R.: Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress, in: Advances in microbial physiologie, herausg. v. A.H. ROSE und J.F. WILKINSON, Bd.1., Academic Press, New York-London, 1967, S. 1-23.

160. POSTGATE, J.R., J.E. CRUMPTON und J.R. HUNTER: The measurement of bacterial viabilitis by slide culture. J.Gen.Microbiol. 24 (1961) 15-24.

161. POWELL, E.O.: A rapid method for determination of the proportion of viable bacteria in a culture. J.Gen.Microbiol. 14 (1956) 153-159.

162. PRETLOW, T.P. und F. SHERMAN: Porphyrins and zincporphyrins in normal and mutant strains of yeast. Biochim.Biophys.Acta 148 (1967) 629-644.

163. RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 2.Aufl., 1965.

164. RAWLINSON, W.A. und J.H. HALE: Prosthetic groups of the cytochromes present in Corynebacterium diphtheriae with especial references to cytochrome a. Biochem.J. 45 (1947) 247-255.

165. SAN MARTIN DE VIALE, L.C. und M. GRINSTEIN: Porphyrin biosynthesis. IV. 5- and 6-COOH porphyrinogens (type III) as normal intermediates in haem biosynthesis. Biochim.Biophys. Acta 158 (1968) 79-91.

166. SANO, S. und S. GRANICK: Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin formation. J.Biol.Chem. 236 (1961) 1173-1180.

167. SANO, S., S. INOUE, Y. TANABE, C. SUMIYA und S. KOIKE: Significance of mitochondria for porphyrin and heme biosynthesis. Science 124 (1959) 275-276.

168. SAWYER, E. und R.A. SMITH: δ-Aminolaevulinate synthesis in Rhodopseudomonas sphaeroides. Bacteriological Proceedings, Soc.Amer.Biologist, Baltimore, 1958, S. 111.

169. SCHERER, J.: Chemisch-physiologische Untersuchungen. Annal. d.Chem.u.Pharm. 40 (1841) 1-64.

170. SCHLENKER, F.S., N.A. TAYLOR und B.P. KIEHN: The chromatographic separation, determination, and daily excretion of urinary porphobilinogen, amino aceton, and δ-aminolevulinic acid. Am.J.Clin.Path. 42 (1964) 349-354.

171. SCHMID, R. und S. SCHWARTZ: Experimental porphyria. III. Hepatic type produced by sedormid. Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 81 (1952) 685-689.

172. SCHMID, R., J.F. FIGEN und S. SCHWARTZ: Experimental porphyria. IV. Studies of liver catalase and other heme enzymes in sedormid porphyria. J.Biol.Chem. 217 (1955) 263-274.

173. SCHROEDER, W.A. und R.T. JONES: Some aspects of the chemistry and function of human and animal hemoglobins, in: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, herausg. v. L. ZECHMEISTER, 23.Bd. Springer Verlag, Wien, 1965, S. 113-194.

174. SHEMIN, D. und D. RITTENBERG: The utilization of glycin for the synthesis of a porphyrin. J.Biol.Chem. 159 (1945) 567-568.

175. SHEMIN, D. und D. RITTENBERG: The biological utilization of glycin for the synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin. J.Biol.Chem. 166 (1946) 621-625.

176. SHEMIN, D., I.M. LONDON und D. RITTENBERG: The in vitro synthesis of heme from glycin by nucleated red blood cells. J.Biol.Chem. 173 (1948) 799-800.

177. SHEMIN, D. und C.S. RUSSEL: Delta-aminolaevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purins. J.Am. Chem. Soc. 75 (1953) 4873-4874.

178. SHEMIN, D., C.S. RUSSEL und T. ABRAMSKY: The succinate-glycin cycle. I. The mechanism of pyrrole synthesis. J.Biol.Chem. 215 (1955) 613-626.

179. SISTRON, W.R.: Observations on the relationship between the formation of photopigments and the synthesis of protein in Rhodopseudomonas spheroides. J.Gen.Microbiol. 28 (1962) 599-605.

180. SNOSWELL, A.M.: Oxidized nicotinamide-adeninedinucleotide-independent lactat dehydrogenase of Lactobacillus arabinosus 17,5. Biochim.Biophys.Acta 77 (1963) 7-19.

181. STADTMAN, E.R.: Allosteric regulation of enzyme activity. Adv. Enzymol. 28 (1966) 41-154.

182. STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. 2.Aufl. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1967.

183. STENT, G.S.: The operon: On its third anniversary. (Modulation of transfer RNA spezies can provide a workable modell of an operator-less operon. Science 144 (1964) 816-820.

184. STENZEL, W. und W. MANNHEIM: On the classification and nomenclature of some nonmotile and coccoid diplobacteria, exhibiting the properties of Achromobacteriaceae. Internat. Bull.bact.Nomencl. 13 (1963) 195-200.

185. STICH, W. und H. EISGRUBER: Die Koproporphyrin- und Hämsynthese durch Hefe und ihre Beeinflussung mit B_2-Vitaminen. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 287 (1951) 19-39.

186. STOCKLAND, A.E. und C.L. SAN CLEMENTE: Lactate dehydrogenase activity in certain strains of Staphylococcus aureus. J.Bacteriol. 95 (1968) 74-80.

187. THUDICHUM, J.L.W.: 10^{th} report of the Medical Officer of the Privy Council, London, 1867, appendix 7, 152.

188. TODD, C.M.: Occurence of cytochrome and coproporphyrin in mycobacteria. Biochem.J. 45 (1949) 386-390.

189. TRUDINGER, P.A. und G.N. COHEN: The effect of 4-methyltryptophan on growth and enzyme systems of Escherichia coli. Biochem.J. 62 (1956) 488-491.

190. ULSHÖFER, B. und M. DOSS: A sensitive method of documentation of porphyrins and hemin thin-layer chromatograms. J.Chromatog. 44 (1969) 407-412.

191. VOGEL, W., D.A. RICHERT, Q. PRIXLEY und M.P. SCHULMANN: Heme synthesis in iron-deficient duck blood. J.Biol.Chem. 235 (1960) 1769-1775.

192. WALDENSTRÖM, J.: Studium über Porphyrie. Acta med.Scand. Suppl. 82 (1937) 3-155.

193. WATSON, C.J.: Porphyrin metabolism, in: Diseases of metabolism, herausg. v. C. DUNCAN, W.B. Saunders Company, Philadelphia-London, 1965, S. 850-887.

194. WELLAND, F. und H.C. SCHWARTZ: Effect of hemin on ALA-synthetase. Clin.Res. 14 (1966) 142-142.

195. WESTALL, R.G.: Isolation of porphobilinogen from the urine of a patient with acute porphyria. Nature 170 (1952) 614-616.

196. WHITE, D.C.: Cytochrome and catalase patterns during growth of Haemophilus parainfluenzae. J.Bacteriol. 83 (1962) 851-859.

197. WILLIAMSON, D.H., P. LUND und H.A. KREBS: The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem.J. 103 (1967) 514-527.

198. WILSON, A.C. und A.B. PAPDEE: Comparative aspects of metabolic control, in: Comparative Biochemistry Bd. VI, herausg. v. M. FLORKIN und H.S. MASON. Academic Press, New York, 1964.

199. WIMPENNY, J.W.T., M.RANLETTA und C.T. GRAY: Repression and derepression of cytochrome c biosynthesis in Escherichia coli. Biochim.Biophys.Acta 73 (1963) 170-172.

200. YATES, R.A. und A.B. PARDEE: Control of pyrimidin biosynthesis in Escherichia coli by a feedback mechanism. J.Biol.Chem. (1956) 757-770.

201. YONEYAMA, Y., H. OHYAMA, Y. SUGITA und H. YOSHIKAWA: Iron-chelating enzyme from duck erythrocytes. Biochim.Biophys.Acta 62 (1962) 261-268.

202. ZEILE, K.: Neuere Entwicklungen der Chemie der Porphyrinfarbstoffe. Angew.Chem. 68 (1956) 193-201.

F. ABBILDUNGS- UND TABELLENNACHWEIS

Die nachfolgend aufgeführten Abbildungen und Tabellen wurden unverändert oder gering modifiziert in folgenden Arbeiten veröffentlicht:

Abb. 13 und 15; 11, 12, 13, 14 und 15 in:
DOSS, M. und W.K. PHILIPP-DORMSTON: The influence of iron on the biosynthesis of porphyrins and the prosthetic group of cytochrome b in Achromobacter metalcaligenes. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352 (1971) 43-51.

Tab. 2 und 3 in:
DOSS, M. und W.K. PHILIPP-DORMSTON: Excretion of porphyrins by bacteria. Experientia 27 (1971) 376-377.

Abb. 6 und 7 in:
DOSS, M. und W.K. PHILIPP-DORMSTON: Porphyrin and heme biosynthesis from endogenous and exogenous δ-aminolevulinic acid in Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Achromobacter metalcaligenes. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352 (1971) 725-733.

Abb. 2, 3 und 4 in:
DOSS, M., B. ULSHÖFER und W.K. PHILIPP-DORMSTON: Quantitative thin-layer chromatography of porphyrins by in situ fluorescence measurements. J.Chromatogr. 63 (1971) 113-120.

Lebenslauf:

Am 25. 12. 1945 wurde ich in Marburg als Sohn des damaligen Privatdozenten und späteren ordentlichen Professors Lic. theol. Dr. phil. habil. Wolfgang Philipp und seiner Ehefrau Editha, geb. Meyer, verw. Löffler, geboren. Am 19. 7. 1969 entsprach der Herr Regierungspräsident in Kassel dem Antrag meines Vaters auf Führung eines Doppelnamens. Seither führen wir den Familiennamen "Philipp-Dormston".

In Marburg besuchte ich die Volksschule und das Realgymnasium, wo ich am 16. 2. 1966 die Reifeprüfung ablegte. Seit dem Sommersemester 1966 studierte ich in Marburg Medizin und bestand hier auch nach 11 Semestern das medizinische Staatsexamen am 21. 12. 1971. Für das Sommersemester 1970 wurde mein Antrag auf Zweiteinschreibung in die naturwissenschaftliche Fakultät (Fachrichtung Biologie) genehmigt. Am 5. 10. 1970 legte ich die Vordiplomprüfung für Biologen ab. Von Oktober 1968 bis Februar 1971 führte ich im Hygiene-Institut der Universität Marburg die Arbeiten für die vorliegende Dissertation durch.

Meine akademischen Lehrer in der medizinischen Fakultät der Philipps-Universität zu Marburg (Lahn) waren die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Betz, Bommer, Brück, Buchholz, Dimroth, Dölle, Doss, Ehrhardt, Exner, Friederich, Ganz, Graul, Golenhofen, Hamelmann, Hamm, Hardewig, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Hort, Jacob, Karlson, Koransky, Korb, Kreutz, Kunz, Lehmann-Grube, Linneweh, Lübbers, Mahr, Mann, Mannheim, Martini, Mattes, du Mesnil de Rochemont, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rodenhäuser, Rohen, Rosenthal, Schiff, Schimassek, Schirren, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, F. Seidel, W. Seidel, Siegert, Spiegelberg, Straub, v.Stosch, Vogt, Voss, Walcher, Wendt, Witzel und Zilliken.